

Universidad de la Laguna

Facultad de Ciencias: Sección de Biología

Departamento de Matemáticas, Estadística e Investigación Operativa y

Departamento de Biología Animal, Edafología y Geología

**Análisis de datos del perfil y metabolismo lipídico de  
hepatocitos y enterocitos aislados de lubinas  
(*Dicentrarchus labrax*) alimentadas con una dieta  
comercial y una dieta sustituida al 50% con aceite de  
*Echium plantagineum*.**

---

**Data analysis of lipid profiles and lipid metabolism of  
hepatocytes and enterocytes from European seabass  
(*Dicentrarchus labrax*) fed a commercial diet and a diet  
50% replaced with  
*Echium plantagineum* oil.**



Trabajo de Fin de Grado

**Aarón Afonso Alí**

Tutorizado por Roberto Dorta Guerra y Nieves Guadalupe Acosta González

Grado en Biología. Septiembre 2019

Este trabajo se ha elaborado tomando parte de los datos de lo que conformará la tesis doctoral titulada “*Sustitución parcial de aceite de pescado por aceite de *Echium plantagineum* L. en la dieta de lubinas de cultivo, *Dicentrarchus labrax* (L.). Influencia sobre el crecimiento, estado de salud y metabolismo lipídico*” aún sin publicar. La investigación se encuadra en el marco del proyecto del Ministerio de Ciencia y Tecnología “Sustitución parcial de aceites de pescado por aceites vegetales en la dieta de peces de interés para la acuicultura. Efectos sobre la integridad funcional del epitelio intestinal”, AGL2003-06877, cuya I.P. es la Dra. Covadonga Rodríguez González. La responsable de la citada Tesis Doctoral, Nieves Guadalupe Acosta González, me concede el permiso de tomar estos datos de manera colaborativa, con el fin de aplicarles el análisis estadístico y de discutir el efecto de los tratamientos a los que fueron sometidos los peces objeto de estudio. Los procedimientos descritos en el apartado de *Material y métodos* se han llevado a cabo tanto por la responsable de esta Tesis Doctoral y cotutora del presente Trabajo de Fin de Grado (TFG), como por quien lo suscribe, siendo igualmente los demás apartados del presente Trabajo de Fin de Grado, obra de su autor, bajo la supervisión de sus tutores académicos.

En La Laguna a 1 de Septiembre de 2019

Fdo. Aarón Afonso Alí



Vº. Bº Nieves Guadalupe Acosta González



# ÍNDICE

<b>1. RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>2. ABSTRACT</b> .....	<b>1</b>
<b>3. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>2</b>
3.1 Situación actual de la acuicultura.....	2
3.2 Búsqueda de fuentes alternativas sostenibles en las dietas animales. ....	3
3.3 Importancia del consumo de pescado y de los ácidos grasos omega 3 de cadena larga LC-PUFA.....	4
3.4 Biosíntesis y metabolismo de los ácidos grasos LC-PUFA.....	5
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	<b>8</b>
4.1 Objetivos generales.....	8
4.2 Objetivos específicos.....	8
<b>5. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>8</b>
5.1 Diseño experimental .....	8
5.2 Piensos .....	9
5.3. Aislamiento celular e incubación con [1- <sup>14</sup> C] 18:2n-6, 18:3n-3 y EPA .....	10
5.4. Extracción lipídica de los cultivos celulares .....	10
5.5 Determinación de las clases lipídicas de hepatocitos y enterocitos control .....	11
5.6 Perfil de ácidos grasos de hepatocitos y enterocitos control.....	11
5.7 Incorporación de los ácidos grasos radiactivos al lípido total en hepatocitos y enterocitos.....	12
5.8 Esterificación del ácido graso radiactivo incorporado en las distintas clases lipídicas del hepatocito y enterocito.....	12
5.9 Elongación y desaturación del ácido graso incorporado en el hepatocito y enterocito.....	13
5.10 Determinación del contenido proteico de los hepatocitos y enterocitos. ....	13
5.11 Análisis estadístico. ....	14
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>15</b>
6.1 Análisis de la composición lipídica de los piensos. ....	15
6.2 Análisis de las clases lipídicas de células control. ....	16
6.3 Análisis del perfil de ácidos grasos de las células control en los tres grupos. ....	18
6.4 Análisis de componentes principales del perfil de ácidos grasos .....	22
6.4.1 Componentes principales en enterocitos.....	22
6.4.2 Componentes principales en hepatocitos .....	23
6.4.3 ANOVA de las componentes en ambos tipos celulares .....	24
6.5 Análisis de la incorporación radiactiva (INRAD) y de la esterificación de ácidos grasos radiactivos en las clases lipídicas. ....	25
6.6 Análisis de la actividad elongasa y desaturasa en el metabolismo mediante seguimiento radiactivo.....	28
<b>7. CONCLUSIONES</b> .....	<b>29</b>
<b>8. CONCLUSIONS</b> .....	<b>30</b>
<b>9. AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>30</b>
<b>10. BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA</b> .....	<b>31</b>
<b>11. ANEXO 1</b> .....	<b>33</b>
<b>12. ANEXO 2</b> .....	<b>33</b>

## 1. RESUMEN

En las próximas décadas la población mundial aumentará en 2.000 millones de habitantes, que sumado a un agotamiento continuo de los recursos, alertan sobre la necesidad de una alternativa sostenible de alimento, apostándose, entre otras opciones, por el cultivo de peces marinos carnívoros, debido a sus ventajas productivas, su elevado contenido en proteína altamente digerible y en ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga omega-3 LC-PUFA, EPA (20:5n-3) y DHA (22:6n-3). No obstante, por lo general, estos animales no son capaces de sintetizar EPA y DHA desde sus precursores vegetales de 18 carbonos (18C), por lo que deben ser suministrados directamente en su dieta, cuya elaboración a base de harinas y aceites procedentes de la pesca extractiva de pequeños peces pelágicos marinos resulta insostenible. En el presente trabajo, se evaluó cómo se ve afectado el perfil y metabolismo lipídico de la lubina cuando reemplazamos en un 50% el contenido graso de origen marino de un pienso comercial por aceite vegetal procedente de *Echium plantagineum* L., carente en LC-PUFA, pero con un balance equilibrado de ácidos grasos precursores de 18C, omega-3 y omega-6. Las conclusiones obtenidas tanto en el análisis del perfil de las clases lipídicas y ácidos grasos como en el seguimiento metabólico radiactivo de enterocitos y hepatocitos sugieren que, a pesar de que se ha detectado cierta actividad  $\Delta 6$ , esta es insuficiente, estando especialmente inactiva en el paso de EPA a DHA. No obstante, la dieta de *Echium* no generó disminuciones significativas de EPA y DHA en hepatocitos y enterocitos, lo que sugiere que el uso de un perfil equilibrado omega-6/omega-3 como el del *Echium plantagineum* favorece la preservación de EPA y DHA en los tejidos, promoviendo la sostenibilidad ambiental en la dieta de un pez carnívoro como la lubina.

**Palabras clave:** LC-PUFA, EPA y DHA, *Echium plantagineum*, metabolismo lipídico, lubina, sostenibilidad ambiental.

## 2. ABSTRACT

In the coming decades, the global population will increase by 2 billion inhabitants, what added to the continuous depletion of resources, warns up the need to search a sustainable food alternative, betting, among others, for the cultivation of carnivorous marine fish, due to their productive advantages and its high protein value and high contents in long chain polyunsaturated omega-3 fatty acids (LC-PUFA) EPA (20:5n-3) and DHA (22:6n-3). However, in general, marine fish are not able to synthesize EPA and DHA from their vegetable precursors of 18C, so they must be directly supplied in their

diet, whose elaboration based upon the extraction of marine pelagic fish, is unsustainable. In the present work, it was evaluated how it affects the profile and lipid metabolism of European seabass when it is replaced 50% of the fat content of marine origin of a commercial feed, with a vegetable oil from *Echium plantagineum* L., lacking in LC-PUFA, but with a well-balanced of omega-3 and omega-6 C18 fatty acid precursors. The conclusions in the analysis of the enterocytes and hepatocytes lipid classes and fatty acids profiles as well as in the metabolic trazability of radioactive fatty acids, suggest that, although certain  $\Delta 6$  activity has been detected, this is particularly inactive in last step from EPA to DHA. In spite of this, the *Echium* diet did not generate significant decreases of EPA and DHA in hepatocytes and enterocytes suggesting that the use of a balanced omega-6 / omega-3 profile such as that of *Echium plantagineum* may help the preservation of EPA and DHA in fish tissues and improves the environmental sustainability of the diet for a carnivorous fish such as the European seabass.

**Key words:** LC-PUFA, EPA and DHA, *Echium plantagineum*, lipid metabolism, European seabass, environmental sustainability.

### 3. INTRODUCCIÓN

#### 3.1 Situación actual de la acuicultura.

Se estima que para el año 2050, la población aumentará en 2.000 millones de habitantes, que sumado al agotamiento continuo de los recursos, alertan sobre la necesidad de la búsqueda de una alternativa sostenible de alimento, apostándose, entre otras, por el cultivo de peces marinos carnívoros (FAO, 2018).

La acuicultura alcanzó en 2016 los 110,2 millones de toneladas, superando ya a la pesca extractiva en consumo directo, con unas 580 especies diferentes cultivadas. El sector acuícola es liderado por China, seguida de varios países asiáticos, siendo las primeras especies producidas las algas *Laminaria* y *Euchema* y varias especies de carpa. La acuicultura europea, sin embargo, tiene un carácter más tecnológico y crece a un ritmo más lento, siendo el mejillón, el salmón atlántico y la trucha arco iris las principales especies producidas, seguidas de lubina, dorada y rodaballo (Iñarra et al., 2018; Apromar, 2018).

Según los datos recogidos en 2016 por la Asociación Empresarial de Acuicultura de España (Apromar) nuestro país se sitúa entre los 20 países con mayor producción acuícola del mundo y el primero de Europa, seguido por el Reino Unido y Francia (FAO, 2018),

siendo uno de los sistemas de cría más exitosos en los últimos años el de Lubina (*Dicentrarchus labrax*) que supera en un 9,1% la producción del año anterior en adultos y en un 12,7% la de juveniles, catalogándose también como la primera especie marina no salmónida que se cultivó comercialmente en Europa (FAO, 2018; Apromar, 2018).

### **3.2 Búsqueda de fuentes alternativas sostenibles en las dietas animales.**

Las dietas tradicionales de los peces carnívoros suplen con éxito los requerimientos nutricionales de ácidos grasos omega-3 (n-3) de cadena larga (LC-PUFA, del inglés Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acid), EPA (20:5 n-3) y el DHA (22:6 n-3), esenciales para el correcto desarrollo de multitud de funciones fisiológicas de vital importancia en estos animales (Sanz et al., 2009). Sin embargo, estas dietas resultan un 50% más caras que las de la ganadería (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2019) y están compuestas, en su mayoría, por harinas y aceites de pescado, extraídos de la captura de pequeños peces pelágicos que sufren sobreexplotación, generando, por tanto, un impacto significativo sobre el medio marino (Hasan & Soto, 2017).

El rendimiento de la acuicultura en relación con el pescado silvestre que es transformado en pienso se mide mediante el índice FIFO (ratios de kg de pescado extraído/ kg de pescado producido), utilizándose muchas veces más pescado como alimento del que se produce (Naylor et al., 2009; Hasan & Soto, 2017). Por consiguiente, uno de los retos más importantes, será el desarrollo de materias primas y tecnologías capaces de reducir al mínimo este ratio FIFO. Desde hace unos años, se están haciendo importantes avances como el uso de desechos de subproductos de pesca para la elaboración de piensos en acuicultura (Iñarra et al., 2018), y sobre todo, dietas con mayor proporción de aceites vegetales (Apromar, 2018). Sin embargo, estos aceites no abastecen la necesidad nutricional lipídica de los peces carnívoros, puesto que carecen de EPA y DHA. Además, por lo general, la mayoría de estos aceites proceden de semillas de oleaginosas, con altas proporciones de LA (linoleico, 18:2 n-6), y menores proporciones de ALA (linolénico, 18:3 n-3) y OL (oleico, 18:1 n-9), produciendo importantes alteraciones metabólicas que quedan reflejadas a nivel de músculo, haciendo que el pescado pierda valor nutricional y afectando negativamente al bienestar y estado de salud de los ejemplares (Díaz-López, 2010; Apraku et al., 2019). Para evitar esto, se utilizan las denominadas dietas “a término”, práctica que consiste en devolverle al animal su dieta marina tradicional (rica en omega 3 LC-PUFA) después de haberle administrado una dieta vegetal durante un

tiempo determinado, regenerando justo antes de su comercialización, las deficiencias inducidas (Díaz Lopez, 2010).

En definitiva, se trata de encontrar fuentes alternativas más sostenibles, que sean además de alta palatabilidad y digestión, disminuyendo el impacto ejercido sobre los ecosistemas marinos, sin mermar el estado de salud y bienestar de los ejemplares de cultivo ni la calidad del producto final (Apromar, 2018; FAO, 2018).

### **3.3 Importancia del consumo de pescado y de los ácidos grasos omega 3 de cadena larga LC-PUFA.**

El pescado, por lo general, contiene todos los aminoácidos necesarios para el desarrollo y mantenimiento de los tejidos humanos (Izquierdo et al., 2001). Pero los principales beneficios descritos para la salud humana radican en la alta cantidad de ácidos grasos omega 3 EPA y DHA, que poseen estos animales, también presentes en algas marinas, pero en cantidades bastante inferiores (Zárate et al., 2017).

Entre las propiedades beneficiosas y funciones del EPA y DHA nos encontramos: efectos cardiovasculares antitrombóticos, y antiarrítmicos, modulaciones del nivel de colesterol total y el VLDL-C (previniendo la aterosclerosis), reducción de la concentración de triglicéridos en plasma, potenciación del sistema inmune, capacidad de corregir problemas visuales y de disminuir la incidencia de enfermedades neurodegenerativas, mejorando las capacidades cognitivas y participando de manera activa en la formación y desarrollo del sistema nervioso. Son precursores de compuestos eicosanoides y docosanoides con efectos antiinflamatorios y de prostanoïdes, que facilitan la transmisión de señales en el sistema nervioso central. Constituyen, a su vez, más del 30% de la estructura lipídica del cerebro y de las células fotorreceptoras de la retina, representando el DHA un 40% del total de los PUFA en las células cerebrales y 2/3 de los lípidos presentes en la membrana de los conos y bastones. Intervienen también en la regulación del ciclo sueño-vigilia, reduciendo las condiciones de estrés y hostilidad y aumentando la eficacia hacia tratamientos contra la depresión, demencia, diabetes tipo 2, cáncer, colitis ulcerativa, enfermedad de Crohn, obstrucción pulmonar crónica, enfermedades renales, psoriasis y artritis reumatoide (Lee et al., 2016; Zárate et al., 2017). Además, se ha estimado que de la madre al feto se transmiten alrededor de 600 mg de DHA/día durante una gestación a término (último trimestre), por lo que la dieta de la madre antes de la concepción es de vital importancia, pues determinará la cantidad de DHA que se transmita al sistema nervioso central del feto (Valenzuela et al., 2013; Voortman et al., 2015).

Aunque nuestros requerimientos de grasas omega-3 varían con la edad, algunas organizaciones de la salud recomiendan una dosis diaria de 250 a 500 miligramos (mg) de EPA y DHA para adultos sanos (3-4 raciones de pescado semanales), siendo la dosis superior en madres gestantes (Zárate et al., 2017).

Los ácidos grasos poliinsaturados más abundantes en el medio terrestre (especialmente en vertebrados herbívoros terrestres), son los ácidos grasos omega 6 (n-6) PUFA, siendo uno de los más representativos el LC-PUFA ARA 20:4 n-6 (ácido araquidónico), que a diferencia de los n-3, posee funciones procoagulantes, proinflamatorias y vasoconstrictoras, antagonistas a las descritas para el EPA y DHA (Schmitz & Ecker, 2008).

Se estima que, para producir un efecto óptimo en la salud, debemos tener un equilibrio aproximado 5:1 (ARA: EPA), pero debido al excesivo consumo actual, por parte de la población occidental, de carne de herbívoros alimentados con piensos de semillas de oleaginosas y productos terrestres procedentes de dichas semillas (cereales, pastas, etc...), este balance omega-6/omega-3 ha llegado a alcanzar la preocupante cifra de 25:1 (Cortés et al., 2013). Ante esto, nos encontramos en una situación metabólica proinflamatoria obvia, que está favoreciendo la aparición de patologías cardiovasculares cada vez más evidentes en la población occidental (Chung & Cho, 2015).

### **3.4 Biosíntesis y metabolismo de los ácidos grasos LC-PUFA.**

De manera más específica, se define como LC-PUFA a aquel ácido graso que posee un número mayor o igual a 20 átomos de carbonos (C<sub>20</sub>) con 2 o más insaturaciones, teniendo la primera insaturación en la posición 3 con respecto al metilo terminal de la cadena hidrocarbonada (carbono omega;  $\omega$  o n), en el caso de los omega-3 (n-3), o en la posición 6, en el caso de los omega 6 (n-6) (Stryer, 2007; Nelson & Cox, 2009). El EPA, ARA y DHA, se almacenan en forma esterificada, preferentemente en fosfolípidos de membrana, y pueden ser movilizados o hidrolizados de éstos por la fosfolipasa A2 o por las glicerolipasas, cuando forman parte de los triglicéridos, para dar lugar a nuevas estructuras de membrana o para formar eicosanoides (Saini & Keum, 2018).

Las microalgas, y muchas macroalgas marinas son los organismos por excelencia capaces de sintetizar los LC-PUFA de *novo* (Lee et al., 2016), sin embargo, en vertebrados, la síntesis de EPA, DHA y ARA empieza a partir de sus precursores de 18 carbonos, el ácido linoleico LA, 18:2n-6 (para los n-6) y el ácido linolénico ALA 18:3n-3 (para los n-3). Las



en EPA. En la vía n-3, a partir del EPA ocurre además una elongación Elov1 5 (4 ó 2) y se produce el DPA, el cual puede tomar la vía  $\Delta 4$  desaturación y transformarse en el DHA (22:5 n-3) (más rara en vertebrados) o la otra vía (ruta de Sprecher) más habitual, produciéndose una elongación Elov1 2 (ó 4) , seguida de una  $\Delta 6$  desaturación y una escisión posterior de 2 carbonos por  $\beta$ -oxidación en los peroxisomas, generándose finalmente el DHA (véase figura 1) (Nelson & Cox, 2009; Stryer, 2007).

Las plantas terrestres no poseen la maquinaria enzimática para sintetizar EPA ni DHA, ya que su ruta de biosíntesis se detiene en sus precursores de 18 carbonos, LA y ALA (Lee et al., 2016). Por ello, en los ambientes terrestres, son los animales herbívoros quienes tienen la maquinaria necesaria para realizar este proceso de producción de LC-PUFA, pero debido a que la genética en el medio terrestre está optimizada hacia la ruta n-6 (Castro et al., 2016), la proporción de ARA es la que se hace más relevante, siendo la síntesis de EPA y DHA significativamente inferior. En el medio acuático, sin embargo, nos encontramos el caso contrario, donde la maquinaria está más optimizada hacia la vía n-3, no obstante, hay diferencias con respecto a la dinámica metabólica en el medio dulceacuícola y marino: en la cadena trófica del primero, nos encontramos una mayor cantidad de los precursores de 18 carbonos (LA y ALA) que de ARA, EPA y DHA, por lo que esta presión evolutiva ha desencadenado que muchos de los peces de este medio tengan cierta capacidad de producir EPA y DHA a partir de sus precursor ALA (Sargent et al., 1999). En el caso del medio marino, los niveles de n-3 LC-PUFAs son relativamente abundantes en comparación con sus precursores, especialmente porque su producción tiene lugar de manera activa en muchas microalgas, por lo que, por lo general, la maquinaria biosintética de los teleósteos marinos carnívoros está muy limitada por la incorporación de los LC-PUFA directamente en su dieta a través de la cadena trófica desde los vegetales marinos (Sargent et al., 1999; Oboh et al., 2017). En el ser humano, la biosíntesis de DHA a partir de EPA es insuficiente, y la síntesis neta de DHA a partir de ALA es menor del 0,2%, es decir, que de 100 gramos de ALA, sólo convertimos 0,2 gramos en DHA (Valenzuela et al., 2013; Lacombe et al., 2018). Si a este hecho se le suma el actual consumo en exceso de productos terrestres y nuestra tendencia genética hacia la síntesis de n-6, generamos un desequilibrio que no somos capaces de suplir con nuestra ruta anabólica (Zárate et al., 2017), lo que hace aún más imperativa la necesidad de un aumento, por parte de la población occidental, del consumo de productos marinos como fuente de ácidos grasos n-3 LC-PUFA.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivos generales

Realizar el análisis estadístico de los datos obtenidos del perfil y metabolismo lipídico de hepatocitos y enterocitos aislados de Lubinas, *Dicentrarchus labrax* (L.), evaluando su capacidad para producir EPA y DHA a partir de sus precursores tras la administración de una dieta experimental sustituida al 50% con aceite de *Echium plantagineum* (L). Se pretende comparar si estos perfiles y actividades metabólicas difieren significativamente cuando administramos una dieta comercial (control), la dieta experimental descrita, o incluso, cuando reponemos la dieta marina comercial.

La finalidad última es disminuir el índice FIFO sin afectar negativamente al metabolismo lipídico, salud y valor nutricional de los ejemplares.

### 4.2 Objetivos específicos

- Comparar el perfil lipídico (clases lipídicas y ácidos grasos) de hepatocitos y enterocitos aislados de las lubinas a las que se les han suministrado las tres dietas (control, *Echium* y *Echium*-control).
- Comparar el patrón de incorporación radiactiva de los ácidos grasos 18:2n-6, 18:3n-3 y EPA marcados con C<sup>14</sup> en el lípido total y las clases lipídicas de los hepatocitos y enterocitos aislados de los ejemplares de lubinas en los tres tratamientos dietarios.
- Comparar la capacidad de los hepatocitos y enterocitos para elongar/desaturar los ácidos grasos 18:2n-6, 18:3n-3 y EPA marcados con C<sup>14</sup> y producir ARA, EPA y DHA.

## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.1 Diseño experimental

En el presente estudio se partió de extractos de lípidos y de datos de perfiles lipídicos de hepatocitos y enterocitos de lubinas sacrificadas tras 7 meses de experimentación, siguiendo el diseño experimental que se describe a continuación.

Se partió de lubinas de unos 150 gramos de peso medio procedentes de una empresa local de engorde de peces en Santa Cruz de Tenerife, que se transportaron al IEO de Santa Cruz de Tenerife y se mantuvieron en aclimatación en las instalaciones en tierra, alimentándose con una dieta comercial (**dieta control**), **DC**, durante 4 semanas. Posteriormente, fueron distribuidos homogéneamente en 9 tanques troncocónicos de 500 L, con agua de mar filtrada (35 ‰), con aireación y renovación constante y bajo fotoperiodo natural. A 3 de

estos tanques se les siguió alimentando con esta dieta comercial, rica en n-3 LC- PUFA, mientras que los 6 tanques restantes fueron alimentados con una **dieta experimental, DE**, formulada con un 50% de aceite de pescado y un 50% de aceite de *Echium*, pobre en n-3 LC-PUFA y rica en 18:2n-6, 18:3n-3, 18:4n-3 y 18:3n-6. A los 4 meses de alimentación, a 3 de los tanques que seguían esta dieta DE, se les retornó a la DC (“lavado” de 3 meses), contándose entonces con este tercer grupo, el **experimental-control, DEC**. La duración total del experimento fue de 7 meses, tomándose 6 individuos por tratamiento (n=6). A pesar de que a lo largo del período de experimentación se realizó un control de la ingesta, crecimiento, supervivencia y estado de salud de los ejemplares, (que no se vieron afectados negativamente por los tratamientos) en este trabajo sólo trataremos los datos relacionados con el perfil y metabolismo lipídico de hepatocitos y enterocitos aislados, y tomados en el séptimo mes.

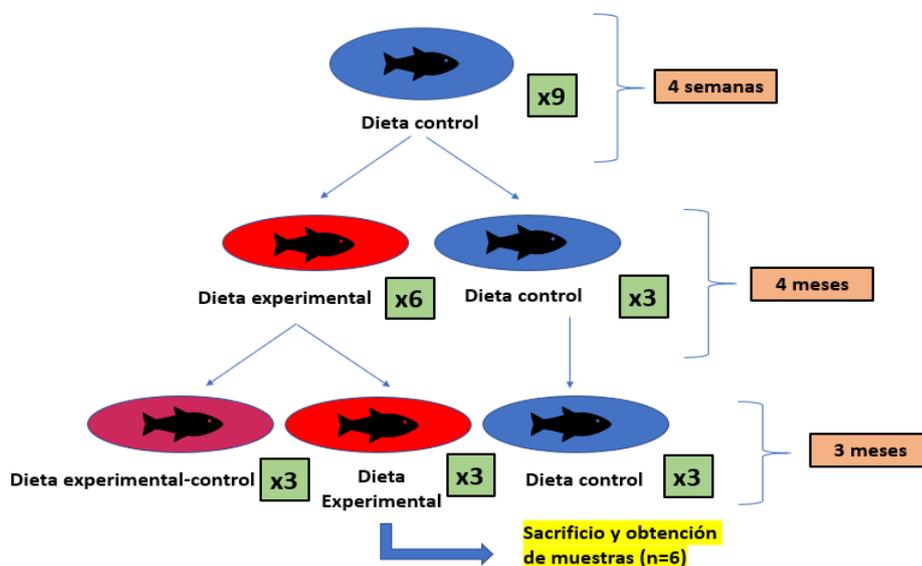


Figura 2. Diseño experimental

## 5.2 Pienso

La DC consistía en un pienso extruido de engorde (3 mm) para lubina, de uso comercial, producido por la empresa Skreting S.A y fabricado fundamentalmente con aceite y harina de pescado, presentando un alto porcentaje de n-3 LC-PUFA. Por otro lado, el pienso DE consistía en un pienso peletizado, también de 3 mm, formulado y fabricado por el grupo de nutrición del Instituto de Acuicultura de la Universidad de Stirling (Escocia). Nutricionalmente hablando, ambas dietas eran isoproteicas e isolipídicas, donde el 50% del aceite de pescado fue sustituido en la dieta DE, por aceite de *Echium*, carente de n-3 LC-PUFA. El aceite de *Echium* fue adquirido en la empresa Goerlich Pharma España y producido mediante el prensado en frío de semillas de *Echium plantagineum*.

### **5.3. Aislamiento celular e incubación con [1-<sup>14</sup>C] 18:2n-6, 18:3n-3 y EPA**

Todo el proceso descrito a continuación se realizó en presencia de hielo para evitar la degradación de los tejidos. El protocolo seguido en el laboratorio para el aislamiento de los enterocitos y hepatocitos fue el establecido por Rodríguez et al., 2002, con ligeras variaciones. En primer lugar, los tejidos fueron limpiados y troceados en solución fisiológica *Hanks balanced salt solution* y colagenasa con el objetivo de disgregar los mismos y aislar las células.

Una vez testada bajo microscopía óptica la integridad y viabilidad celular de la suspensión resultante, ésta era repartida en Flasks de cultivo celular, donde se incubaron 6 mL de suspensión celular de cada tejido en medio M199/NaCl (BioSigma) con 0,20 µCi de cada ácido graso radiactivo, durante 2 horas. Los ácidos grasos elegidos fueron [1-<sup>14</sup>C] ácido linoleico (18:2n-6, LA), y [1-<sup>14</sup>C] ácido linolénico (18:3n-3, ALA) (PerkinElmer, Inc., USA) como ácidos grasos precursores de los n-6 y n-3 LC-PUFA, respectivamente. El [1-<sup>14</sup>C] ácido eicosapentaenoico (20:5n-3, EPA) fue usado en los cultivos también como precursor más inmediato del DHA. Para ambos tejidos, se utilizó además un cultivo control de 6 mL de la suspensión celular sin añadir ningún ácido graso.

### **5.4. Extracción lipídica de los cultivos celulares**

Después de 2 horas de incubación y tras el lavado de las células para eliminar el radiactivo no incorporado, se procedió a la extracción de los lípidos según el método Folch (1957), adaptado por Christie (Christie, 2003). Previamente, se tomaron alícuotas de 100 µL de cada suspensión celular, que fueron almacenadas a -70°C hasta el momento de la determinación de su contenido en proteína por el método de Lowry (Lowry et al., 1951), con el fin de expresar los datos lipídicos por mg de proteína.

Siguiendo el protocolo de Christie, el resto de cada suspensión se mezcló en un tubo de cristal con 8 mL de cloroformo-metanol (2:1, v/v) con 0,01% de hidroxitolueno butilado (BHT) como antioxidante, y 2 mL de KCl. Se evaporó totalmente el cloroformo-metanol de la fase inferior y se obtuvo el peso del lípido total por gravimetría. El extracto fue disuelto a una concentración conocida de 10 mg/mL en cloroformo-metanol (2:1, v/v) y almacenado a -20°C hasta su posterior análisis de clases lipídicas y ácidos grasos.

### **5.5 Determinación de las clases lipídicas de hepatocitos y enterocitos control**

La separación de las diferentes clases lipídicas del lípido total se llevó a cabo mediante cromatografía en capa fina de alta resolución en placas de HPTLC (*High-performance thin-layer chromatography*) mediante un doble desarrollo unidimensional (Olsen & Henderson, 1989). Como fase móvil, se utilizó primero una disolución para separar los lípidos polares, consistente en isopropanol, cloroformo, metilacetato, metanol y KCl al 0,25% (5:5:5:2:1,8 en volumen). Una vez desarrolladas las placas hasta la mitad, se introdujeron en vacío para eliminar todo resto de solventes. Posteriormente, se preparó otra fase móvil para separar los lípidos neutros consistente en hexano, éter y ácido acético (20:5:0,5), desarrollando las placas hasta su parte superior, para separar las clases lipídicas neutras.

Una vez desarrolladas las placas, se tiñeron de forma homogénea con una solución de acetato cúprico y ácido ortofosfórico en metanol y se quemaron en una estufa a 160°C durante 15 minutos. Las placas se escanearon en el CAMAG TLC Visualizer (CAMAG, Muttenz, Suiza) mediante el software winCATS versión 1.4.4 para determinar las bandas de las diferentes clases lipídicas por densitometría con patrones conocidos, incluidos junto con las muestras en las placas de HPTLC. Su procesamiento y cuantificación se realizó mediante el software VideoScan versión 1.02, de forma que se obtuvo la proporción de cada clase lipídica de la muestra.

### **5.6 Perfil de ácidos grasos de hepatocitos y enterocitos control.**

Se realizó la transmetilación de una cantidad del extracto lipídico (1 mg), con el objetivo de hidrolizar y metilar los ácidos grasos desde las clases lipídicas donde se encontraban esterificados, obteniéndose así los ésteres metílicos de ácidos grasos (del inglés *Fatty acid methyl esters*; FAMES) que poseen mayor volatilidad que los ácidos grasos libres, pudiendo ser analizados por cromatografía de gases (Christie, 2003). Para cuantificar la cantidad de ácidos grasos en valor absoluto, se añadió a las muestras un 5% de estándar interno (19:0).

La purificación de los ésteres metílicos se llevó a cabo por cromatografía en capa fina TLC (de 20 cm x 20 cm x 0,25 mm), utilizando como fase móvil una mezcla de hexano, éter y ácido acético (90:10:1, v/v/v). Una vez desarrolladas las placas, se tiñeron con yodina (al 1% en cloromorfo) por el lateral donde se encuentra el estándar y en la parte superior donde se ubica el BHT, pudiendo de esta forma localizar la ubicación de los

FAMEs. Éstos fueron extraídos de la placa raspando el gel de sílice y añadiéndoles hexano:éter (1:1, v/v) para solubilizarlos. Una vez retirada la sílice, los FAMEs fueron disueltos en n-hexano y almacenados en viales de cristal, bajo atmósfera de nitrógeno, hasta su posterior identificación mediante un cromatógrafo de gases (TRACE-GC Thermo Scientific, Milán, Italia) y el software ChromQuest 5.0. La resolución de los FAMEs por el cromatógrafo se consigue gracias a un horno con una programación de tiempo y temperatura crecientes, que separa los ácidos metilados en función de su temperatura de fusión ( $T_m$ ) y polaridad, cuya programación está disponible en Diaz-López, 2010. La identificación de cada ácido graso se realizó con ayuda de un patrón consistente en una mezcla de aceites de pescado y estándares comerciales con composición y tiempos de retención conocidos. El contenido de cada ácido graso en las muestras fue expresado en porcentaje de área, si bien, la inclusión de un 5% del 19:0 en el proceso de transmetilación, permitió también establecer el contenido absoluto de cada ácido graso en la muestra.

### **5.7 Incorporación de los ácidos grasos radiactivos al lípido total en hepatocitos y enterocitos.**

Una décima parte del extracto del lípido total (1/10) se alicuotó en viales de centelleo y se les añadió 4,5 mL de líquido de centelleo para proceder a la determinación de la radiactividad incorporada, medida en DPM (desintegraciones por minuto). La radiación  $\beta$  emitida se cuantificó en un contador de centelleo líquido (TRI-CARB 4810TR, Perkin Elmer, Singapur). Los resultados obtenidos en DPM se transformaron en pmol de ácido radiactivo/mg proteína/h ( $\text{pmol.mg pp}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ), teniendo en cuenta la actividad específica de cada ácido graso, el contenido de lípido total, la cantidad de proteína asociada y el tiempo de incubación con los correspondientes ácidos grasos radiactivos.

### **5.8 Esterificación del ácido graso radiactivo incorporado en las distintas clases lipídicas del hepatocito y enterocito.**

Para la separación de las clases lipídicas de las muestras radiactivas se aplicó la misma metodología empleada con las células control, salvo que, una vez desarrolladas las placas, se tiñeron primero con una solución de yodo (1% yodo/cloroformo) para facilitar la localización y procesamiento de las bandas radiactivas. Posteriormente, se introdujeron las placas en un casete cerrado (Exposure Cassete-K, BioRad, Madrid, España) y en oscuridad, con una lámina sensible a la radiactividad (Imaging Screen-K, Biorad, Madrid, España) separada por una lámina de aluminio. Transcurridas dos semanas, se procedió a

escanear las imágenes obtenidas con un sistema de adquisición de imagen (Molecular Imager Fx, BioRad, Madrid, España) y a su procesado con el software Quantity One versión 4.5.2, obteniéndose así la distribución relativa de la radiactividad incorporada en cada clase lipídica.

### **5.9 Elongación y desaturación del ácido graso incorporado en el hepatocito y enterocito.**

Se siguió la metodología de transmetilación descrita para las muestras control, salvo que, en este caso, no se incluyó estándar interno. Para realizar la separación de los ácidos grasos marcados radiactivamente por TLC, se usó cromatografía de argentación con nitrato de plata, consistente en la impregnación las placas con una solución de 2 gramos de nitrato de plata en 20 mL de acetonitrilo y su posterior activación durante 30 minutos a 110°C (Wilson & Sargent, 1992). Se añadió también en el lateral de la placa una mezcla de FAMEs, que contenían cada uno de los sustratos y otros ácidos grasos radiactivos, a modo de estándar externo. Las placas se desarrollaron en tolueno/acetonitrilo (95:5, v/v), siendo posible separar los ácidos grasos según su longitud de cadena y grado de insaturación (Wilson & Sargent, 1992).

Para visualizar las bandas radiactivas separadas, se siguió la metodología descrita en el apartado anterior, por exposición de la TLC a la lámina sensible a radiación  $\beta$ . Cada banda se identificó con ayuda del patrón externo de composición conocida y acorde a su posición relativa a otras bandas, expresándose el resultado de cada ácido graso marcado en porcentaje de área (Rodríguez et al., 2002).

### **5.10 Determinación del contenido proteico de los hepatocitos y enterocitos.**

Para cuantificar el contenido de proteína se utilizó el método descrito por Lowry et al., (1951). Se incubaron las alícuotas recogidas de los cultivos celulares en una solución digestora (0,25% SDS + 1M NaOH) a 60°C durante 1 hora. Una vez desestructurada la célula y digerida la proteína, se hace reaccionar con cobre y reactivo de Folin. El cobre produce un complejo con el nitrógeno del enlace peptídico y el reactivo de Folin es reducido por la tirosina y triptófano, de tal manera que se forma un complejo coloreado que se puede medir por espectrofotometría, además, se realiza una curva patrón de concentraciones proteicas conocidas (con albúmina) para extrapolar la concentración de nuestra muestra. La lectura se lleva a cabo mediante un lector de placas (Thermo Scientific Appliskan, Vantaa, Finlandia) con el software Appliskan 2.3.

### 5.11 Análisis estadístico.

Se realizó una prueba t de muestras independientes para determinar si había diferencias en la composición de ácidos grasos entre los dos tipos de piensos. Se evaluaron los valores atípicos por inspección de los diagramas de caja para cada grupo. La normalidad se verificó por medio del test de Shapiro-Wilk, y la homogeneidad de varianzas por medio de la prueba de Levene. En los casos donde no se verificó la normalidad se hizo uso el test no paramétrico U de Mann-Whitney.

Se realizó un ANOVA de una vía para determinar el efecto de los diferentes tipos de dieta sobre las clases lipídicas y FAMES. Las dietas se clasificaron en tres grupos: Dieta control (n = 6), Dieta experimental (n = 6) y Dieta experimental-control (n = 6). Al igual que en la prueba t, se evaluaron los valores atípicos, la normalidad y la homocedasticidad. Para el análisis post-hoc de pares de media se utilizó el test de Tukey. En los casos donde no se verificó la homocedasticidad se hizo uso de las transformaciones arcsen y logaritmo para estabilizar la varianza. De la misma manera, cuando dichas transformaciones no surtieron efecto, se aplicaron los test de Welch y de Brown Forsythe. En este último caso, para el estudio post-hoc de medias, se aplicaron los test T3 de Dunnett y T2 de Tamhane. Para los casos donde no se verificó la normalidad, se hizo uso del test no paramétrico de Kruskal-Wallis y las comparaciones múltiples por pares se llevaron a cabo por medio de la U de Mann-Whitney con corrección de Bonferroni. La evaluación del comportamiento de los ácidos grasos control se llevó a cabo mediante un análisis de componentes principales (PCA). Previamente, con el fin determinar si los datos eran factorizables, se estudió la matriz de correlación, la medida general de Kaiser-Meyer-Olkin (KMO) y la prueba de esfericidad de Bartlett, cuyos resultados justifican la aplicación de la técnica. Para mejorar la interpretabilidad de las componentes se hizo uso de la rotación ortogonal Varimax.

Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el software IBM SPSS Statistics 25 software, USA. En todo el texto se considera un valor de  $p < 0,05$  como estadísticamente significativo.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Análisis de la composición lipídica de los piensos.

Observando la tabla 1, vemos que la dieta DC (pienso comercial) aporta una mayor cantidad de ácidos grasos saturados (SFAs), donde destaca el ácido palmítico (16:0). La dieta DE (pienso *Echium*), por otro lado, posee una proporción significativamente mayor de monoenoos (MUFAs), donde destacan el 20:1n-9 y el 22:1n-11, encontrándose en una proporción 5 y 6 veces mayor, respectivamente, que en la dieta DC.

**Tabla 1. Comparación del contenido en ácidos grasos, expresado en % de área, de los piensos DC y DE, analizados mediante la prueba de comparación de medias t de Student.**

Ácidos grasos	Pienso comercial	Pienso <i>Echium</i>
<b>SFAs***</b>	27,41 ± 0,26	17,32 ± 0,36
16:0***	17,37 ± 0,19	11,15 ± 0,21
<b>MUFAs***</b>	23,54 ± 0,14	33,08 ± 0,69
16:1 n-7***	5,09 ± 0,05	3,24 ± 0,05
18:1 n-9	12,26 ± 0,12	12,41 ± 0,27
20:1 n-9	0,95 ± 0,05	5,51 ± 0,13
22:1 n-11***	0,84 ± 0,02	6,82 ± 0,32
<b>n-6 PUFAs***</b>	20,10 ± 0,10	19,01 ± 0,03
18:2 n-6***	18,73 ± 0,05	13,84 ± 0,05
18:3 n-6*	0,18 ± 0,02	4,51 ± 0,07
20:2 n-6	0,16 ± 0,02	0,16 ± 0,01
20:3 n-6*	0,09 ± 0,00	0,04 ± 0,00
20:4 n-6***	0,61 ± 0,01	0,31 ± 0,01
22:4 n-6*	0,10 ± 0,02	0,05 ± 0,01
22:5 n-6***	0,24 ± 0,02	0,10 ± 0,01
<b>n-3 PUFAs**</b>	25,74 ± 0,16	29,89 ± 1,06
18:3 n-3***	2,42 ± 0,08	13,66 ± 0,26
18:4 n-3***	1,77 ± 0,05	5,27 ± 0,25
20:3 n-3	0,07 ± 0,01	0,07 ± 0,01
20:4 n-3***	0,44 ± 0,01	0,29 ± 0,01
20:5 n-3***	9,35 ± 0,01	4,16 ± 0,21
22:5 n-3***	0,99 ± 0,01	0,46 ± 0,02
22:6 n-3***	10,32 ± 0,03	5,79 ± 0,33
<b>n-3 LC-PUFA***</b>	21,55 ± 0,04	10,95 ± 0,58
<b>n-3/n-6***</b>	1,28 ± 0,01	1,57 ± 0,05
<b>ARA/EPA**</b>	0,07 ± 0,00	0,07 ± 0,00
<b>DHA/EPA***</b>	1,10 ± 0,00	1,39 ± 0,01
<b>% de lípido en peso seco*</b>	17,11 ± 0,24	19,17 ± 1,13
<b>Contenido total (g ac. graso/kg de pienso seco)**</b>	117,72 ± 2,88	140,39 ± 6,86

SFAs, sumatorio total de saturados; MUFAs, sumatorio total de monoinsaturados; n-6 y n-3 PUFAs, sumatorio de los poliinsaturados omega 6 y 3 respectivamente, n-3 LC PUFA, sumatorio de los poliinsaturados omega 3 de cadena larga. Los valores separados con una línea diagonal indican relaciones entre ácidos grasos o entre sus sumatorios. Los valores son expresados como medias ± desviación estándar, n = 3. Nivel de significación: indica las diferencias significativas entre los grupos, \* ( $p < 0,05$ ) significativo; \*\* ( $p < 0,01$ ) significación alta; \*\*\* ( $p < 0,001$ ) significación muy alta.

Dentro de los n-6, vemos que el pienso DE aporta una menor cantidad de LA (18:2 n-6) y posee un contenido relativamente alto de ácido gamma-linolénico (GLA, 18:3 n-6), que es prácticamente despreciable en el otro pienso. Por otro lado, observamos que el pienso DC aporta el doble de n-3 y n-6 LC-PUFA, incluyendo al EPA (20:5 n-3), DHA (22:6 n-3) y ARA (20:4 n-6). Debemos destacar también que en la dieta DE, el aceite de *Echium*

aporta una gran cantidad de ácido linolénico (ALA, 18:3 n-3) y de ácido estearidónico (SDA, 18:4n-3). Éste último destaca por ser poco común en el mundo vegetal y por poseer importantes propiedades beneficiosas para la salud humana, similares a las descritas para el DHA (Rincón et al., 2015).

A pesar de haber sido diseñadas con carácter isolipídico, se observa en el pienso DC que, por cada 100 gramos de pienso seco, tenemos 17,11 gramos de lípido, mientras que el pienso DE aporta 19,7 gramos de lípido por cada 100 gramos de pienso seco. En general, observamos que las principales diferencias entre ambos piensos radican en los niveles de n-3 y n-6 LC-PUFA, que son sustituidos en el pienso DE por sus principales precursores de 18 carbonos (ALA y LA), además del OA, GLA y SDA, encontrándose éstos en unas proporciones bastante equilibradas. La relación OA/ALA/LA es casi 1/1/1, representando el 39,91% del total de ácidos grasos, lo que convierte esta dieta en una alternativa prometedora (Díaz López, 2010; Tocher et al., 2006).

## **6.2 Análisis de las clases lipídicas de células control.**

Vemos en la tabla 2 la proporción en % de área de las diferentes clases lipídicas de los 3 grupos dietarios en ambos tipos celulares. Se observa que no se producen diferencias significativas con respecto al total de los lípidos polares y los lípidos neutros entre ninguno de los grupos dietarios. Esto no se ajusta a lo descrito en otros estudios (Bell et al., 2010; Saini & Keum, 2018; Apraku et al., 2019), donde por lo general, una carencia en la dieta de n-3 LC-PUFA, inducida por la inclusión de aceites vegetales, está ligada a una caída de los lípidos polares, a favor del aumento de triglicéridos, por lo que, a priori, se podría sospechar que la dieta no ha inducido a un desequilibrio lipídico en los tejidos analizados.

Con respecto al lípido total, no se observan diferencias significativas en ninguno de los grupos dentro de los enterocitos, pero sí en los hepatocitos, donde el contenido graso es muy superior en el grupo DE. Se aprecia también, en ambos tipos celulares, que los niveles de triglicéridos se disparan en el grupo DE. Por lo que, a pesar de su perfil equilibrado, la dieta experimental induce a un aumento del contenido lipídico total, que se traduce también en un aumento del almacenaje del exceso de grasa en forma de triglicéridos en el hígado, efectos que se revierten después del lavado en el grupo DEC.

**Tabla 2. Cantidad relativa en % de área de las diferentes clases lipídicas y lípido total, medido en mg de lípido/mg de proteína, de los tratamientos DC, DE y DEC en las dos tipologías celulares.**

Clases lipídicas	ENTEROCITOS			HEPATOCITOS		
	DC	DE	DEC	DC	DE	DEC
LPC	0,64 ± 0,56	0,52 ± 0,54	0,87 ± 0,58	0,25 ± 0,16	0,14 ± 0,15	0,20 ± 0,05
SM	3,10 ± 0,61	3,51 ± 0,63	3,63 ± 0,37	2,21 ± 0,48	2,14 ± 0,41	2,45 ± 0,38
PC*	14,63 ± 1,60	13,73 ± 0,95	13,60 ± 0,63	13,74 ± 0,46 <b>a</b>	13,44 ± 2,35 <b>a</b>	16,31 ± 1,33 <b>b</b>
PS*	1,07 ± 0,70	1,10 ± 0,67	0,95 ± 0,75	0,78 ± 0,66 <b>a</b>	1,57 ± 0,87 <b>ab</b>	2,06 ± 0,85 <b>b</b>
PI	4,44 ± 1,18	4,13 ± 0,97	4,20 ± 0,65	4,13 ± 0,57	3,69 ± 0,75	4,47 ± 1,20
PG	5,41 ± 2,02	4,49 ± 1,50	5,77 ± 1,10	4,63 ± 1,79	4,18 ± 2,58	4,62 ± 1,48
PE	7,58 ± 2,00	8,17 ± 2,32	7,35 ± 1,25	8,68 ± 2,49	8,14 ± 1,44	9,85 ± 1,47
PUK*	2,99 ± 1,82	3,91 ± 0,97	4,16 ± 1,50	3,24 ± 1,40 <b>b</b>	1,19 ± 0,72 <b>a</b>	1,54 ± 0,83 <b>a</b>
<b>TLP</b>	39,87 ± 4,86	39,56 ± 2,41	40,52 ± 2,86	37,65 ± 1,40	34,49 ± 6,89	41,50 ± 3,44
MAG***	5,52 ± 1,50	3,95 ± 0,74	5,17 ± 0,92	5,54 ± 0,87 <b>b</b>	3,06 ± 0,16 <b>a</b>	3,48 ± 0,40 <b>a</b>
DAG	1,67 ± 0,80	1,54 ± 0,43	1,79 ± 0,31	2,00 ± 0,24	1,52 ± 0,38	1,75 ± 0,40
CHO**/**	15,72 ± 0,95 <b>ab</b>	14,94 ± 1,36 <b>a</b>	17,37 ± 1,94 <b>b</b>	12,22 ± 1,35 <b>ab</b>	10,14 ± 1,77 <b>a</b>	13,36 ± 1,52 <b>b</b>
FFA*	3,19 ± 1,35	2,51 ± 0,75	2,73 ± 0,43	4,63 ± 1,12 <b>a</b>	2,64 ± 1,34 <b>b</b>	4,74 ± 0,99 <b>a</b>
TAG**/**	23,28 ± 3,43 <b>a</b>	31,38 ± 5,05 <b>b</b>	24,13 ± 2,88 <b>a</b>	29,35 ± 2,95 <b>a</b>	43,90 ± 6,47 <b>b</b>	30,56 ± 3,51 <b>a</b>
SE**/**	10,76 ± 4,33 <b>b</b>	6,11 ± 1,69 <b>a</b>	8,28 ± 1,87 <b>ab</b>	8,61 ± 1,33 <b>b</b>	4,25 ± 1,87 <b>a</b>	4,62 ± 2,26 <b>a</b>
<b>TLN</b>	60,13 ± 4,86	60,44 ± 2,41	59,48 ± 2,86	62,35 ± 1,40	65,51 ± 6,89	58,50 ± 3,44
<b>Lípido/Proteína (mg líp/ mg pro)</b> ***	0,43 ± 0,16	0,43 ± 0,07	0,51 ± 0,18	0,51 ± 0,25 <b>a</b>	1,00 ± 0,19 <b>b</b>	0,77 ± 0,17 <b>ab</b>

LPC, lisofosfatidilcolina; SM, esfingomielina; PC, fosfatidilcolina; PS, fosfatidilserina; PI, fosfatidilinositol; PG, fosfatidilglicerol; PE, fosfatidiletanolamina; PUK, lípidos polares desconocidos; TLP, lípidos polares totales; MAG, monoacilgliceridos; DAG, diacilgliceridos; CHO, colesterol; FFA, ácidos grasos libres; TAG, triacilglicéridos; SE, ésteres de esterol; TLN, lípidos neutros totales; Lípido/Proteína(mg líp/ mg pro): valor en mg de lípido total por mg de proteína. Los valores han sido expresados como medias ± desviación estándar, n = 6. Nivel de significación: indica diferencias significativas entre los grupos, \* ( $p < 0,05$ ) significativo; \*\* ( $p < 0,01$ ) significación alta; \*\*\* ( $p < 0,001$ ) significación muy alta. Los datos separados por una barra diagonal indican las diferencias significativas en ambas tipologías celulares, respectivamente (enterocitos/hepatocitos). Los valores sin barra diagonal indican que las diferencias significativas sólo se producen en hepatocitos. Las letras *a*, *b* y *c* indican la agrupación de los tratamientos en virtud de la presencia o ausencia de diferencias significativas, de tal manera que los valores de los tratamientos con una misma letra dentro de una clase lipídica indican la ausencia de diferencias significativas (y viceversa) entre dichos valores.

Vemos que los niveles de fosfatidilcolina y fosfatidilserina no difieren significativamente en los hepatocitos de los grupos DC y DE, potenciándose tras el lavado en los individuos DEC. Teniendo en cuenta que, la fosfatidilcolina, además de cumplir funciones importantes como fosfolípido de membrana, actúa también como reservorio lipídico de LC-PUFA C<sub>20</sub> (Díaz-López, 2010), a priori, podríamos pensar que la deficiencia está produciendo cierta retención selectiva de ácidos grasos de cadena larga, que perdura en los hepatocitos DEC incluso tras el lavado.

En general, estos resultados manifiestan, por un lado, que a pesar de que en los enterocitos DE nos encontramos cierto aumento de triglicéridos, no se observan diferencias altamente significativas en casi ninguno de los parámetros de interés, lo que manifiesta una mayor capacidad o necesidad del intestino de amortiguar los cambios lipídicos inducidos por la dieta, que el hígado, donde si se observa claramente la acumulación de grasa descrita en la bibliografía. Por otro lado, vemos que las alteraciones provocadas por la dieta DE no solamente son regeneradas una vez le restauramos la dieta tradicional DC, sino que se potencian algunos parámetros de interés como los niveles de PC y PS.

En definitiva, a pesar de los cambios observados en el grupo DE, los parámetros de interés no se alteran de manera significativa en comparación con otros estudios, donde al administrar una dieta vegetal se da una bajada notable de los LP y un aumento más drástico de los TAG (Bell et al., 2010; Molina, 2016; Apraku et al., 2019). Esta tendencia a una mejor homeostasis de los lípidos en tejidos metabólicamente tan vitales como el intestino y el hígado podría explicarse por una proporción equilibrada de los ácidos grasos 18C en la DE, que estaría favoreciendo una actividad equilibrada de las esterasas (enzimas inespecíficas encargadas de la esterificación de los ácidos grasos en las diferentes clases lipídicas) y las lipasas (enzimas que se encargan de la escisión del ácido graso de su esqueleto hidrocarbonado y de su hidrólisis) sobre los lípidos dietarios (Stryer, 2007; Nelson & Cox, 2009), haciendo que actúen de una manera más equitativa entre una variedad más equilibrada y amplia de sustratos, facilitando, por tanto, el mantenimiento de un perfil lipídico de acuerdo a las funciones fisiológicas del órgano en cuestión.

### **6.3 Análisis del perfil de ácidos grasos de las células control en los tres grupos.**

En la tabla 3 se muestra el perfil de ácidos grasos de cada tipología celular en cada tratamiento. Se observa que el aumento de lípido total y triglicéridos en hepatocitos del tratamiento DE coincide a su vez, con un aumento del contenido total de ácidos grasos por unidad de proteína, que bajan cuando retomamos su dieta tradicional.

Observando la tabla de piensos (tabla 1), vemos que la dieta DE aporta menor cantidad de SFAs (saturados), que explica una caída de sus ácidos grasos más representativos, 16:0 y 18:0, en los individuos DE, restaurándose tras el lavado en el grupo DEC. En el conjunto total de monoenoos (MUFAs), nos encontramos un efecto interesante. Se observa que, a pesar de que la DE aporta mucha más cantidad de MUFAs, no se aprecian diferencias significativas entre ninguno de los 3 grupos en el caso los hepatocitos, pero sí en los enterocitos, donde estos niveles disminuyen significativamente en el grupo DEC. Esto manifiesta, por un lado, que ambas tipologías celulares son capaces de regular las diferencias en el aporte de monoenoos producidas por la dieta DE, y por otro lado, que la aparente actividad lipolítica asociada al aumento de monoenoos en la DE, permanece incluso después del lavado en los individuos DEC, potenciándose en el caso de los enterocitos.

**Tabla 3. Perfil de los diferentes ácidos grasos, expresados en % de área, de enterocitos y hepatocitos en los individuos de los tres tratamientos, y cantidad total de ácido graso, expresado en  $\mu\text{g ac. graso}/\text{mg proteína}$ .**

Ácidos grasos	ENTEROCITOS			HEPATOCITOS		
	DC	DE	DEC	DC	DE	DEC
<i>SFAs</i> ***/**	34,57 ± 1,39 c	24,58 ± 1,44 a	32,05 ± 1,28 b	34,18 ± 0,52 b	26,51 ± 1,29 a	36,27 ± 6,89 b
16:0***/**	18,51 ± 1,02 c	13,54 ± 0,66 a	16,48 ± 0,67 b	22,05 ± 0,57 b	17,90 ± 1,28 a	22,67 ± 4,14 b
18:0***/**	12,50 ± 1,15 b	8,08 ± 1,08 a	12,05 ± 1,30 b	9,73 ± 0,63 b	6,37 ± 0,80 a	11,27 ± 2,98 b
<i>MUFAs</i> **/ns	22,70 ± 2,63 ab	24,91 ± 0,93 b	20,69 ± 1,21 a	34,22 ± 2,49	34,99 ± 3,04	32,02 ± 2,79
16:1 n-7*/****	2,85 ± 0,31 b	2,32 ± 0,29 a	2,46 ± 0,42 ab	4,17 ± 0,38 b	2,93 ± 0,34 a	3,64 ± 0,53 b
18:1 n-9	11,82 ± 1,47	11,54 ± 0,35	11,10 ± 0,75	23,75 ± 1,73	21,61 ± 1,77	22,47 ± 2,39
20:1 n-9***/**	0,88 ± 0,11 a	3,35 ± 0,11 b	0,89 ± 0,12 a	0,77 ± 0,11 a	2,83 ± 0,31 b	0,66 ± 0,08 a
22:1 n-11**/**	0,41 ± 0,11 a	2,42 ± 0,26 b	0,42 ± 0,11 a	0,34 ± 0,05 a	2,02 ± 0,33 b	0,22 ± 0,05 a
<i>n-6 PUFAs</i> **/**	12,09 ± 1,98 a	15,28 ± 1,00 b	14,32 ± 0,90 b	7,79 ± 0,33 a	11,64 ± 0,68 b	8,10 ± 1,08 ab
18:2 n-6 ns/**	8,06 ± 1,99	9,53 ± 0,86	9,01 ± 1,26	5,11 ± 0,18 a	7,55 ± 0,52 b	5,47 ± 0,82 a
18:3 n-6***/**	0,16 ± 0,03 a	2,49 ± 0,36 c	0,33 ± 0,11 b	0,25 ± 0,06 a	2,27 ± 0,32 b	0,36 ± 0,07 a
20:2 n-6 ns/**	0,82 ± 0,07	0,96 ± 0,12	0,89 ± 0,07	0,39 ± 0,04 a	0,52 ± 0,06 b	0,35 ± 0,05 a
20:3 n-6***/**	0,20 ± 0,06 a	0,36 ± 0,07 b	0,20 ± 0,04 a	0,10 ± 0,03 a	0,16 ± 0,03 b	0,09 ± 0,02 a
20:4 n-6***/**	2,32 ± 0,37 b	1,63 ± 0,23 a	3,17 ± 0,46 c	1,50 ± 0,22 b	0,89 ± 0,16 a	1,48 ± 0,23 b
22:5 n-6***/**	0,38 ± 0,05 b	0,21 ± 0,02 a	0,52 ± 0,15 c	0,32 ± 0,07 b	0,17 ± 0,05 a	0,28 ± 0,03 b
<i>n-3 PUFAs</i> */ns	26,07 ± 3,76 a	33,63 ± 0,49 b	29,36 ± 1,49 a	21,42 ± 2,25	25,68 ± 3,41	22,23 ± 3,12
18:3 n-3***/**	0,87 ± 0,26 a	7,93 ± 1,26 c	1,65 ± 0,30 b	0,56 ± 0,04 a	5,56 ± 0,60 c	0,91 ± 0,15 b
18:4 n-3***/**	0,56 ± 0,11 a	2,36 ± 0,43 b	0,75 ± 0,11 a	0,37 ± 0,06 a	1,89 ± 0,25 b	0,48 ± 0,10 a
20:3 n-3 ns/**	0,10 ± 0,03	0,13 ± 0,02	0,13 ± 0,06	0,05 ± 0,01 a	0,12 ± 0,03 b	0,05 ± 0,01 a
20:4 n-3***/**	0,21 ± 0,02 a	0,31 ± 0,03 c	0,26 ± 0,04 b	0,15 ± 0,01 a	0,24 ± 0,04 b	0,15 ± 0,02 a
20:5 n-3*/**	7,91 ± 1,25 ab	7,54 ± 0,48 a	9,06 ± 0,90 b	5,89 ± 0,48 b	4,00 ± 0,61 a	6,03 ± 0,86 b
22:5 n-3 **/**	0,79 ± 0,13 b	0,64 ± 0,06 a	0,83 ± 0,05 b	0,64 ± 0,06 b	0,51 ± 0,05 a	0,54 ± 0,07 a
22:6 n-3	15,64 ± 2,60	14,72 ± 1,35	16,69 ± 0,64	13,76 ± 1,86	13,36 ± 3,44	14,05 ± 2,17
<i>n-3 LC-PUFA</i>	24,64 ± 3,73	23,35 ± 1,60	26,96 ± 1,41	20,49 ± 2,25	18,23 ± 4,06	20,83 ± 3,06
<i>n-3/n-6</i> ns/**	2,17 ± 0,27	2,21 ± 0,13	2,05 ± 0,04	2,74 ± 0,21 b	2,22 ± 0,34 a	2,75 ± 0,20 b
<i>ARA/EPA</i> **/ns	0,30 ± 0,05 b	0,22 ± 0,03 a	0,35 ± 0,06 b	0,25 ± 0,03	0,22 ± 0,01	0,25 ± 0,03
<i>DHA/EPA</i> ns/**	1,98 ± 0,21	1,96 ± 0,19	1,85 ± 0,15	2,33 ± 0,27 a	3,31 ± 0,34 b	2,33 ± 0,13 a
<i>AC GRASO/PROT</i>	90,69 ± 37,71	116,70 ± 22,35	73,97 ± 21,42	168,78 ± 46,18 a	496,61 ± 128,31 b	321,27 ± 120,24 a

SFAs, sumatorio total de saturados; MUFAs, sumatorio total de monoinsaturados; n-6 y n-3 PUFAs, sumatorio de los poliinsaturados omega 6 y 3 respectivamente, n-3 LC PUFA, sumatorio de los poliinsaturados omega 3 de cadena larga. AC GRASO/PROT:  $\mu\text{g ac. graso total}/\text{mg proteína}$ . Los valores separados con una línea diagonal indican relaciones entre los ácidos grasos o entre sus sumatorios. Los valores son expresados como medias  $\pm$  desviación estándar, n = 6. Nivel de significación: indica las diferencias significativas entre los grupos, \* ( $p < 0,05$ ) significativo; \*\* ( $p < 0,01$ ) significación alta; \*\*\* ( $p < 0,001$ ) significación muy alta; ns, no significativo. El nivel de significación se expresa para ambos tipos celulares, respectivamente (enterocitos/hepatocitos). Las letras a, b y c indican la agrupación de los tratamientos en virtud de la presencia o ausencia de diferencias significativas, de tal manera que los valores de los tratamientos con una misma letra dentro de un ácido graso indican la ausencia de diferencias significativas (y viceversa) entre ellos.

Con respecto a los n-6 PUFAs, resulta llamativo que a pesar de que la DC aporta más cantidad de LA (18:2 n-6), en los enterocitos no se aprecian diferencias significativas entre los 3 grupos, mientras que, en hepatocitos, vemos que los individuos DE poseen mayor proporción de éste, por lo que podría haberse dado un proceso de almacenamiento de LA en el hígado. Observamos también que a pesar de que el pienso DE y DC aportan la misma cantidad de 20:2 n-6, éste se encuentra en mayor proporción en los hepatocitos de la dieta DE, lo que podría suponer que se ha promovido una elongación por Elov1 5 del 18:2 n-6 hasta 20: 2 n-6 en los individuos DE, en respuesta a la deficiencia dietaria inducida para los LC-PUFA.

Por otro lado, la dieta DC también aporta mayor cantidad de ácido 20:3 n-6 (precursor inmediato de ARA), sin embargo, son los individuos DE los que poseen mayor proporción de éste, por lo que es posible que se haya sintetizado también cierta cantidad de este ácido graso desde su precursor 18:2 n-6, lo que supondría actividad  $\Delta 8$  o  $\Delta 6$  desaturasa. Observando los niveles de ARA (20:4 n-6), nos encontramos una disminución significativa de éste en las células de los individuos DE y un aumento en los enterocitos DEC. Esto manifiesta, por un lado, que los niveles de ARA aumentan tras el lavado en el grupo DEC, y por otro lado, que la célula no es capaz de compensar éstos niveles en el grupo DE, debido, o bien, a la ausencia de actividad  $\Delta 5$  desaturasa, o bien, a una inhibición competitiva en la  $\Delta 5$  con el EPA (Tocher, 2003; Castro et al., 2016).

Con respecto a los ácidos grasos n-3, que son los que toman mayor relevancia en este estudio, nos encontramos que el mayor aporte de ALA (18:3 n-3) y de ácido estearidónico (18:4 n-3) proporcionados por la DE quedan reflejados en el perfil lipídico, presentando los individuos de este tratamiento una cantidad mucho mayor de éstos que los DC, si bien, se observa que después del lavado, las cantidades de 18:4 n-3 vuelven a restaurarse, siendo iguales en los grupos DEC y DC. Esto no ocurre en el caso de ALA, donde se observa en los individuos DEC, tanto en enterocitos como en hepatocitos, que incluso después del lavado, éstos siguen presentando cantidades significativamente más altas de ALA, lo que evidencia una dinámica de fijación diferente en los grupos producto de la alternación en la composición lipídica de la DE. Observamos también un efecto interesante del 20:3 n-3, ya que, a pesar de que ambas dietas contienen la misma cantidad de este ácido graso, sus niveles aumentan significativamente en los hepatocitos de los individuos DE, por lo que se puede sospechar, en virtud de lo observado, que existe también cierta actividad Elov1 5, produciendo 20:3 n-3 a partir de ALA, de manera similar a lo ocurrido con el 18:2 n-6. También vemos otra situación llamativa en el 20:4 n-3 (precursor inmediato de EPA), donde encontramos que los individuos DE poseen mayor cantidad de éste, aun teniendo una proporción menor en su dieta, lo que podría indicar que se produce una elongación directa del 18:4 n-3 aportado por el *Echium* o incluso una desaturación y posterior elongación a partir del 18:3 n-3.

Como ya se ha dicho anteriormente, sabemos que la DE aporta la mitad de EPA (20:5 n-3). A pesar de ello, en el caso de los enterocitos, observamos que los niveles de EPA no difieren significativamente entre los individuos DC y DE. En el caso de los hepatocitos, aunque sí se observa cierta disminución significativa de EPA en los individuos DE, ésta

no resulta tan brusca en comparación con estudios similares (Bell et al., 2010), por lo que cabría pensar que, o bien el pez posee actividad  $\Delta 5$ , reparando con éxito las deficiencias inducidas de EPA en los enterocitos, o bien, que se está produciendo una retención selectiva de EPA. En cualquier caso, esta síntesis/retención parece incluso potenciarse en ambas tipologías celulares una vez hecho el lavado, siendo los individuos DEC los que contienen mayor cantidad de EPA que los DE y DC.

Se observa que a pesar de la deficiencia dietaria, tanto en los niveles de DHA (22:6 n-3), como en el sumatorio total de los n-3 LC-PUFA no se encuentran diferencias significativas en ambas tipologías celulares en ninguno de los 3 grupos, por lo que podríamos sospechar que existe de nuevo una retención selectiva de estos ácidos grasos, o lo que es más improbable, que se estén sintetizando a partir de sus precursores, lo que implicaría alta actividad desaturasa ( $\Delta 6$  ó  $\Delta 4$ ).

Centrándonos ahora en el índice ARA/EPA y DHA/EPA, observamos efectos interesantes en ambas tipologías celulares. En el caso del primer coeficiente, vemos que solamente se producen diferencias significativas en los enterocitos, donde observamos un cociente más bajo en los individuos DE que en los otros dos grupos, que no difieren entre sí. Esto implica, por un lado, que los enterocitos poseen mayores proporciones de EPA con respecto a ARA que los hepatocitos, y por otro lado, confirma lo ya sabido, que ante una deficiencia, toma relevancia la retención de n-3. Observando el coeficiente DHA/EPA vemos que las diferencias significativas se producen solamente en hepatocitos, donde en el grupo DE encontramos un índice mucho mayor que en los otros dos grupos, que no difieren entre sí. Si nos fijamos en las proporciones de DHA y EPA por separado, vemos que este coeficiente tiene sentido, ya que en hepatocitos sí que se produce una caída de EPA, pero no de DHA, lo que manifiesta que la célula tiene mayor preferencia a compensar sus niveles de DHA que de EPA.

Comparando este estudio con el realizado en dorada (*Sparus aurata*) en Diaz-López, (2010), observamos resultados similares, donde el aceite de *Echium plantagineum*, en combinación con una dieta a término, no solo no altera de manera significativa los niveles de n-3 LC-PUFA, sino que llega a causar el efecto contrario, mejorando sus condiciones fisiológicas y disminuyendo los depósitos lipídicos plasmáticos y de grasa perivisceral (Diaz Lopez, 2010; Tocher et al., 2006).

Estudios novedosos sobre expresión génica han demostrado que la lubina expresa el gen Fad2 (que codifica para la enzima  $\Delta 6$  desaturasa), en el hígado e intestino cuando son

sometidas a una carencia de LC-PUFA (Greay, 2012; Greay, 2010), pero es posible que esta actividad esté inhibida por una composición desequilibrada en la dieta o por el propio aporte dietario de EPA y DHA, que desfavorece su síntesis, como ya se ha observado en otros estudios (Giménez, 2017; Triana-García et al., 2013). Por ello, es esencial que los resultados expuestos hasta el momento en células control, se complementen con los del seguimiento metabólico con marcaje radiactivo, utilizando los ácidos grasos precursores de EPA y DHA, que confirmaran si existe o no actividad enzimática elongasa/desaturasa en las células vivas.

En general, los resultados obtenidos en el análisis de las clases lipídicas y el perfil de ácidos grasos de las células control, manifiestan que, los enterocitos, tienden a mantener la homeostasis lipídica de manera más eficiente, manifestando una mayor capacidad de amortiguar la carencia de LC-PUFA que los hepatocitos. Esto puede justificarse debido a que el carácter estructural de la membrana y la función biológica de los enterocitos como agente osmorregulador e intermediario en numerosos procesos de señalización celular obliga a mantener un perfil lipídico acorde a estas necesidades de una manera más imperativa que el hígado, que si puede permitirse estas alteraciones, evidenciadas principalmente en un mayor acúmulo de grasa en forma de triglicéridos.

#### **6.4 Análisis de componentes principales del perfil de ácidos grasos**

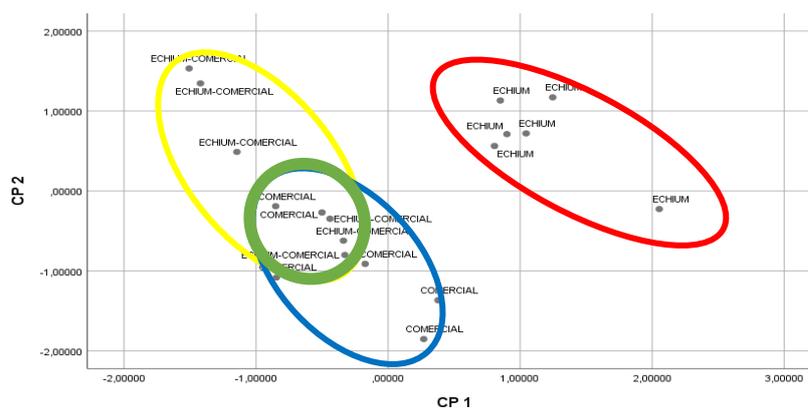
El propósito del ACP (análisis de componentes principales) consiste en hallar nuevas variables que sean combinaciones lineales de las variables originales, capaces de caracterizar los individuos (pez) de una muestra. En los problemas tratados en este trabajo, el número de componentes (nuevas variables) seleccionadas fue de 2, ya que el porcentaje de información que acumulaban era lo suficientemente elevado. Asimismo, hemos comprobado mediante la comunalidad (porcentaje de información acumulada de cada variable, cuando el mínimo de componentes elegido es 1, 2, 3, etc.), que 2 componentes son suficientes, ya que las variables originales quedan lo suficientemente explicadas.

##### **6.4.1 Componentes principales en enterocitos**

En enterocitos, ambas componentes explican un 71,88% de la varianza total, donde la componente 1 (CP 1) explica el 46,62% y la componente 2 (CP 2) explica el 25,254%. La CP1 se correlaciona positivamente con todos los precursores de 18 carbonos n-6 y n-3, incluyendo también a 20: 4 n-3 y monoeno como el 18: 1 n-9 y 22: 1 n-11, y se correlaciona negativamente con los saturados (16:0 y 18:0), con n-3 LC-PUFA como

20:3 n-3, 22: 5 n-3, EPA y DHA, y con n-6 LC-PUFA 20:5 n-6 y ARA, mientras que la CP 2 está correlacionada negativamente con los saturados 16:0 y 18:0, con los monoenos 16:1 n-7 y 18:1 n-9 y con el LA (18: 2 n-6) y el 22:5 n-3, estando los demás ácidos grasos correlacionados positivamente con esta componente.

En la figura 3 se muestra la agrupación de cada individuo dentro de las componentes. Se aprecia claramente cómo los DE quedan englobados en un grupo (círculo rojo) mientras que los individuos con las otras dos dietas, la DC y la DEC en otros dos grupos más cercanos entre sí (círculo azul y círculo amarillo, respectivamente). Vemos que, pesar de que los individuos DC y DEC quedan englobados en diferentes grupos, poseen una zona de intersección (círculo verde), por lo que las alteraciones inducidas por la dieta DE quedan representadas en las componentes, que clasifica a los individuos del grupo DEC bastante próximos al DC, mientras que los DE quedan muy alejados de estos valores. Se podría suponer que las pequeñas diferencias entre DEC y DE pueden manifestar, tal vez, el efecto potenciador en los enterocitos tras el lavado, puesto que vemos que no se aproxima a los valores de la CP 1 en la DE.



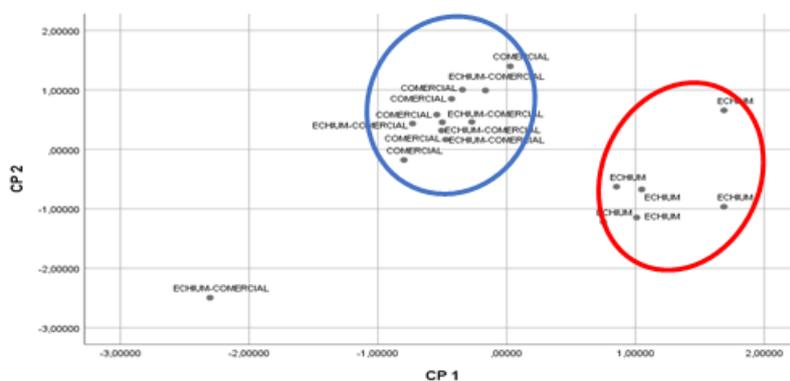
**Figura 3.** Puntuaciones factoriales (componente 1 y 2) de los enterocitos a partir de la composición de ácidos grasos en función de la dieta.

#### 6.4.2 Componentes principales en hepatocitos

En hepatocitos, ambas componentes explican un 81,25% de la varianza total, donde la componente 1 explica el 54,63% y la componente 2 explica el 26,62%. La CP 1 se correlaciona positivamente con todos los precursores de 18 carbonos n-6 y n-3, incluyendo también a PUFAs como 20:2 n-6, 20:3 n-6, 20:3 n-3 y 20:4 n-3, los monoenos 20:1 n-9 y 22:1 n-11 y el DHA (20:6 n-3), correlacionándose negativamente con los saturados (16:0 y 18:0), con los monoenos 16:1 n-7 y 18:1 n-9 y con algunos de los LC-PUFA como ARA (20:4n-6), EPA (20:5 n-3), 22:5 n-6 y 22:5n-3. La CP 2 está correlacionada negativamente con todos los precursores n-3 y n-6 de 18 carbonos, con el saturado 16:0, con algunos PUFAs como 20:2 n-6, 20:3 n-6, 20:3 n-3 y 20:4 n-3, con los

monoenoos 20:1 n-9 y 22:1 n-11, con el LA (18: 2 n-6) y el 22:5 n-3 y se correlaciona positivamente con el saturado 18:0, con los monoenoos 16:1 n-7, 18:1 n-9, con LC-PUFA como ARA, EPA, DHA y 22:5 n-6 y 22:5 n-3.

En la figura 4, se representa la agrupación de cada individuo dentro de las componentes, donde se aprecia claramente cómo los peces DE quedan englobados en un grupo (círculo rojo) mientras que los DC y DEC quedan englobados en otro grupo único (círculo azul). Esto manifiesta las mismas conclusiones que en enterocitos, pero, en este caso, tanto las deficiencias inducidas por la dieta DE como el lavado del tratamiento DEC quedan representados en las componentes de una manera mucho más evidente, que clasifica a los individuos del grupo DEC y DC sin distinción, quedando los DE bastante alejados de estos valores.



**Figura 4.** Puntuaciones factoriales (componente 1 y 2) de los hepatocitos a partir de la composición de ácidos grasos en función de la dieta.

### 6.4.3 ANOVA de las componentes en ambos tipos celulares

Como se puede observar en la tabla 4, el análisis de ANOVA de las componentes nos confirma lo ya comentado en apartados anteriores.

**Tabla 4.** ANOVA de las componentes principales en enterocitos y hepatocitos

Componentes	ENTEROCITOS			HEPATOCITOS		
	DC	DE	DEC	DC	DE	DEC
CP1**/**	-0,29 ± 0,21 a	1,14 ± 0,19 b	-0,86 ± 0,23 a	-0,43 ± 0,11 a	1,17 ± 0,17 b	-0,74 ± 0,32 a
CP2**/ns	-0,94 ± 0,26 a	0,68 ± 0,21 b	0,26 ± 0,41 a	0,66 ± 0,22	-0,66 ± 0,28	0,001 ± 0,51

CP1, componente 1; CP2, componente 2. Los valores son expresados como medias ± desviación estándar, n = 6. Nivel de significación: expresa que existen diferencias significativas entre los tratamientos, \* ( $p < 0,05$ ) significativo \*\* ( $p < 0,001$ ) altamente significativo; ns, no significativo. El nivel de significación se expresa para ambos tipos celulares, enterocitos/hepatocitos. Las letras a, b y c indican la agrupación de los tratamientos en virtud de la presencia o ausencia de diferencias significativas, de tal manera que los valores de los tratamientos con una misma letra dentro de una componente indican la ausencia de diferencias significativas (y viceversa) entre ellos.

Tanto en hepatocitos como en enterocitos vemos que en la CP 1 se producen diferencias altamente significativas en el grupo DE con respecto a los otros dos, siendo similares DC y DEC, que los reconoce un mismo grupo. Vemos en la componente 2, que en los hepatocitos no se producen diferencias significativas en ninguno de los 3 grupos, lo que

manifiesta cierta similitud con respecto al perfil lipídico entre los individuos de los 3 tratamientos.

### **6.5 Análisis de la incorporación radiactiva (INRAD) y de la esterificación de ácidos grasos radiactivos en las clases lipídicas.**

En la tabla 5 y 6 se representa el patrón de incorporación y esterificación de los ácidos grasos radiactivos LA, ALA y EPA en el lípido total (INRAD) y sus diferentes clases lipídicas, para cada uno de los tratamientos y tipo celular, analizadas mediante ANOVA de dos vías. Se adjunta también como anexo 1, una imagen de las diferentes placas para aportar una visión general sobre este patrón de bandas radiactivas y facilitar así la comprensión de los resultados.

Por lo general, salta a la vista en los datos de incorporación radiactiva al lípido total, que los enterocitos asimilan una cantidad más alta de los tres ácidos grasos que los hepatocitos, especialmente de los ácidos grasos de 18C, probablemente, porque su función biológica como agente receptor y transportador de nutrientes les dote de mecanismos que permitan su incorporación con mayor facilidad en las 2 horas de incubación a que se sometieron ambos tipos celulares.

No se observa interacción de los factores (dieta y ácido graso) en el patrón de esterificación de las diferentes clases lipídicas, si bien, sí que se aprecia interacción en la incorporación radiactiva de los hepatocitos, donde los individuos DC poseen mayor preferencia de incorporación de EPA que el resto, lo que parece indicar que la dieta DC optimiza la absorción de EPA con respecto a los otros ácidos grasos incorporados, sin observarse esta tendencia en la DE ni DEC. Teniendo en cuenta que la dieta DC aporta el doble de EPA, a priori, cabría esperar que la deficiencia inducida por la DE desencadenase mecanismos para una optimización de la absorción de éste, sin embargo, nos encontramos en la situación inversa, donde el descenso en la captación de EPA perdura en la célula incluso después del lavado con DEC. Una posible hipótesis que podríamos plantearnos ante esto es que al encontrarse mayores niveles de EPA en el pienso DC, existe también una mayor probabilidad de que se incorpore en la célula, y que el mayor requerimiento de este ácido graso, descrito en el medio marino, genere su movilización continua. Sin embargo, el posible efecto de retención selectiva de n-3 LC-PUFA ya descrito, por parte de los individuos DE ante la deficiencia inducida, podría afectar a su movilización neta a otros tejidos, desencadenando mecanismos moleculares que dificultan la entrada de EPA en la célula, y que perduran incluso después del lavado.

**Tabla 5. ANOVA de dos vías de la incorporación radiactiva al lípido total, expresado en pmol · unidad de proteína<sup>-1</sup> · h<sup>-1</sup> y esterificación de ácidos grasos radiactivos en sus clases lipídicas en enterocitos, expresado en % de área.**

Clases lipídicas	18: 2 n-6						18: 3 n-3						ANOVA de dos vías				
	DC		DE		DEC		DC		DE		DEC		DIETA		ÁC. GRASO		
	DC	DE	DC	DE	DC	DE	DC	DE	DC	DE	DEC	C vs E	E vs EC	2 vs 3	vs EP	INT	
TAG*	62,57 ± 8,06 a	73,55 ± 3,07 b	61,55 ± 8,64 a	76,18 ± 2,46 b	63,42 ± 8,95 a	76,18 ± 2,46 b	48,63 ± 8,50 a	57,52 ± 3,47 b	46,40 ± 5,60 a	a (C, EC) b (E)	a (EP) b (3,2)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
FFA*	2,61 ± 2,10 b	1,25 ± 0,71 a	3,59 ± 3,08 b	1,10 ± 0,74 a	3,85 ± 3,64 b	1,10 ± 0,74 a	1,23 ± 0,58 b	0,85 ± 0,39 a	2,06 ± 1,41 b	a (E) b (C, EC)	a (EP) b (3,2)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
DAG	3,65 ± 0,48	3,78 ± 0,52	4,08 ± 0,74	3,75 ± 1,23	3,91 ± 0,68	3,75 ± 1,23	3,29 ± 1,05	2,63 ± 1,03	3,10 ± 0,58	NS	a (EP) b (3,2)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
MAG	1,83 ± 0,52	1,50 ± 0,56	2,19 ± 0,97	1,55 ± 0,75	1,68 ± 0,42	1,55 ± 0,75	2,51 ± 1,56	1,95 ± 0,70	2,29 ± 0,96	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
TLN*	73,20 ± 7,14 a	82,87 ± 3,03 b	74,12 ± 5,55 a	85,06 ± 2,63 b	75,02 ± 5,41 a	85,06 ± 2,63 b	57,31 ± 7,34 a	64,54 ± 2,96 b	55,78 ± 4,38 a	a (C, EC) b (E)	a (EP) b (3,2)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
PE	2,04 ± 0,37	1,44 ± 0,27	2,15 ± 1,15	0,93 ± 0,35	1,54 ± 0,74	0,93 ± 0,35	3,91 ± 1,47	3,22 ± 0,99	3,35 ± 1,14	NS	a (3,2) b (EP)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
PG*	1,20 ± 0,74 b	0,56 ± 0,32 a	1,00 ± 0,52 b	0,42 ± 0,13 a	0,93 ± 0,53 b	0,42 ± 0,13 a	1,17 ± 0,24 b	0,63 ± 0,25 a	1,10 ± 0,47 b	a (E) b (C, EC)	a (3,2) b (EP)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
PI*	3,84 ± 1,13 b	2,53 ± 0,52 a	3,52 ± 0,55 b	1,94 ± 0,35 a	2,85 ± 0,47 b	1,94 ± 0,35 a	5,04 ± 1,22 b	4,53 ± 0,54 a	4,86 ± 0,70 ab	a (E) b (C, EC)	a (3) b (2) c (EP)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
PS*	0,23 ± 0,12 b	0,14 ± 0,05 a	0,21 ± 0,08 ab	0,09 ± 0,05 a	0,18 ± 0,14 b	0,09 ± 0,05 a	0,60 ± 0,44 b	0,30 ± 0,11 a	0,48 ± 0,19 ab	a (E) b (C) ab (EC)	a (3,2) b (EP)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
PC*	17,84 ± 5,53 b	10,91 ± 2,16 a	16,74 ± 3,79 b	10,43 ± 2,28 a	17,40 ± 4,19 b	10,43 ± 2,28 a	29,86 ± 5,00 b	25,17 ± 2,60 a	31,25 ± 4,33 b	a (E) b (C, EC)	a (3,2) b (EP)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
TLP*	26,80 ± 7,14 b	17,13 ± 3,03 a	25,88 ± 5,55 b	14,94 ± 2,63 a	24,98 ± 5,41 b	14,94 ± 2,63 a	42,69 ± 7,34 b	35,46 ± 2,96 a	44,22 ± 4,38 b	a (E) b (C, EC)	a (3,2) b (EP)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
INRAD*	236,39 ± 63,15 a	352,31 ± 62,49 b	164,68 ± 76,90 a	310,07 ± 90,16 b	145,10 ± 74,55 a	310,07 ± 90,16 b	233,77 ± 50,30	281,95 ± 87,25	196,12 ± 58,71	a (C, EC) b (E)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

**Tabla 6. ANOVA de dos vías de la incorporación radiactiva al lípido total, expresado en pmol · unidad de proteína<sup>-1</sup> · h<sup>-1</sup> y esterificación de ácidos grasos radiactivos en sus clases lipídicas en hepatocitos, expresado en % de área.**

Clases lipídicas	18: 2 n-6						18: 3 n-3						ANOVA de dos vías				
	DC		DE		DEC		DC		DE		DEC		DIETA		ÁC. GRASO		
	DC	DE	DC	DE	DC	DE	DC	DE	DC	DE	DEC	C vs E	E vs EC	2 vs 3	vs EP	INT	
TAG	56,09 ± 7,08	51,52 ± 17,89	44,46 ± 20,26	59,01 ± 16,29	50,85 ± 17,79	59,01 ± 16,29	62,07 ± 9,19	61,51 ± 7,43	62,30 ± 10,40	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
FFA*	19,26 ± 7,34 a	25,7 ± 16,7 ab	36,20 ± 20,9 b	20,19 ± 15,9 ab	31,42 ± 19,5 b	20,19 ± 15,9 ab	3,74 ± 1,31 a	8,96 ± 7,68 ab	14,60 ± 10,73 b	a (C) ab (E) b (EC)	a (EP) ab (3) b (2)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
DAG*	4,12 ± 0,73 b	4,90 ± 1,49 b	3,15 ± 0,61 a	4,05 ± 1,41 b	2,79 ± 1,26 a	4,05 ± 1,41 b	3,16 ± 1,20 b	3,03 ± 1,32 b	2,72 ± 1,45 a	a (EC) b (E, C)	a (3, EP) b (2)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
MAG	4,95 ± 0,92	5,03 ± 2,00	4,45 ± 1,05	1,99 ± 1,07	1,42 ± 0,61	1,99 ± 1,07	3,43 ± 2,23	1,91 ± 1,07	2,05 ± 0,54	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
TLN*	87,35 ± 2,46 a	90,37 ± 1,75 b	91,42 ± 4,32 b	87,76 ± 3,40 ab	89,43 ± 3,67 b	87,76 ± 3,40 ab	75,11 ± 6,73 a	78,43 ± 2,20 ab	84,50 ± 6,26 b	a (C) ab (E) b (EC)	a (EP) b (2,3)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
PE*	1,31 ± 0,50 ab	1,36 ± 0,29 b	1,05 ± 0,43 a	1,16 ± 0,45 b	0,91 ± 0,37 a	1,16 ± 0,45 b	2,66 ± 1,10 ab	3,35 ± 0,63 b	2,02 ± 0,50 a	a (EC) ab (C) b (E)	a (2, 3) b (EP)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
PG*	0,49 ± 0,12 b	0,46 ± 0,29 ab	0,35 ± 0,26 a	0,45 ± 0,15 a	0,54 ± 0,23 ab	0,45 ± 0,15 a	0,82 ± 0,42 b	0,45 ± 0,16 a	0,36 ± 0,21 a	a (EC) ab (E) b (C)	a (2, 3) b (EP)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
PI*	1,12 ± 0,57 b	0,76 ± 0,11 a	0,63 ± 0,46 a	0,79 ± 0,22 b	0,63 ± 0,29 ab	0,79 ± 0,22 b	3,46 ± 2,12 b	2,61 ± 0,67 b	1,16 ± 0,73 a	a (C, E) b (EC)	a (2, 3) b (EP)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
PS	0,20 ± 0,06	0,18 ± 0,11	0,17 ± 0,09	0,26 ± 0,15	0,27 ± 0,19	0,26 ± 0,15	0,35 ± 0,30	0,42 ± 0,20	0,26 ± 0,17	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
PC*	8,10 ± 1,46 b	5,27 ± 1,12 a	4,79 ± 3,08 a	7,54 ± 1,68 a	6,35 ± 3,34 a	7,54 ± 1,68 a	15,71 ± 2,78 b	13,08 ± 1,86 ab	10,32 ± 5,32 a	a (E, EC) b (C)	a (2, 3) b (EP)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
TLP*	12,65 ± 2,46 b	9,63 ± 1,75 ab	8,58 ± 4,32 a	12,24 ± 3,40 ab	10,57 ± 3,67 a	12,24 ± 3,40 ab	24,89 ± 6,73 b	21,57 ± 2,20 b	15,50 ± 6,26 a	a (EC) ab (E) b (C)	a (2, 3) b (EP)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
INRAD*	114, 42 ± 39,30	128,77 ± 27,1	130,06 ± 26,3	76,48 ± 22,86	74,13 ± 9,05	76,48 ± 22,86	<b>217,53 ± 37,4</b> B	127,45 ± 45,02	137,58 ± 25,38	0	a (3) b (2) c (EP)	C-EP	NS	NS	NS	NS	NS

TAG, triacilglicéridos; FFA, ácidos grasos libres; DAG, diacilglicéridos; MAG, monoacilglicéridos; TLN, lípidos neutros totales; PE, fosfatidiletanolamina; PG, fosfatidilglicerol; PI, fosfatidilinositol; PS, fosfatidiserina; PC, fosfatidilcolina; TLP, lípidos polares totales; INRAD, incorporación radiactiva al lípido total de la célula. Los valores se expresan como medias ± desviación estándar, n = 6. Nivel de significación: indica que existen diferencias significativas entre los grupos, \* (p < 0,05), existen diferencias significativas en al menos uno de los grupos; NS, no existen diferencias significativas. Las interacciones entre factores se representan con letra mayúscula y en negrita. Tabla ANOVA de dos vías: C, dieta control; E, dieta experimental; EC, dieta experimental-control; 2, linoleico; 3, linoléico; EP, EPA; INT, interacción entre factores. El valor 0 indica que no se puede agrupar de manera fiable por la presencia de interacción. Las letras a, b y c indican la agrupación de los tratamientos en virtud de la presencia o ausencia de diferencias significativas, de tal manera que los valores de los tratamientos con una misma letra dentro de una clase lipídica indican la ausencia de diferencias significativas (y viceversa) entre ellos.

Centrándonos en el patrón de esterificación en enterocitos, se observa una tendencia general de los ácidos grasos 18:2 n-6 y 18:3 n-3 a esterificarse de forma preferente en triglicéridos, especialmente en el grupo DE, lo que coincide con las conclusiones obtenidas en el apartado 6.2 y con lo descrito en la bibliografía. Si bien, en hepatocitos, no se aprecian diferencias significativas con respecto a los niveles de incorporación en triglicéridos en ninguna de las dietas y en ninguno de los ácidos grasos, lo que supondría que el EPA también se esté esterificando como triglicéridos en igual proporción, independientemente de la dieta suministrada.

Con respecto al nivel de ácidos grasos libres, en el caso de enterocitos, tenemos niveles significativamente más bajos en la DE con respecto a la DC y DEC, siendo LA y ALA los que se encuentran en mayor proporción. Esto sugiere, por un lado, que el grupo DE esterifica mayores cantidades de ácido graso que los otros dos grupos, y por otro lado, que todas las dietas incorporan a sus clases lipídicas cantidades significativamente mayores de EPA que de LA y ALA. En el caso de los hepatocitos, encontramos que no se observan diferencias significativas con respecto a los niveles de ácidos grasos libres, si bien, sí que se aprecian diferencias entre los 3 tratamientos, donde vemos que el grupo DC es el que incorpora mayores cantidades de ácidos grasos a las clases lipídicas que el grupo DEC, encontrándose DE en una situación intermedia.

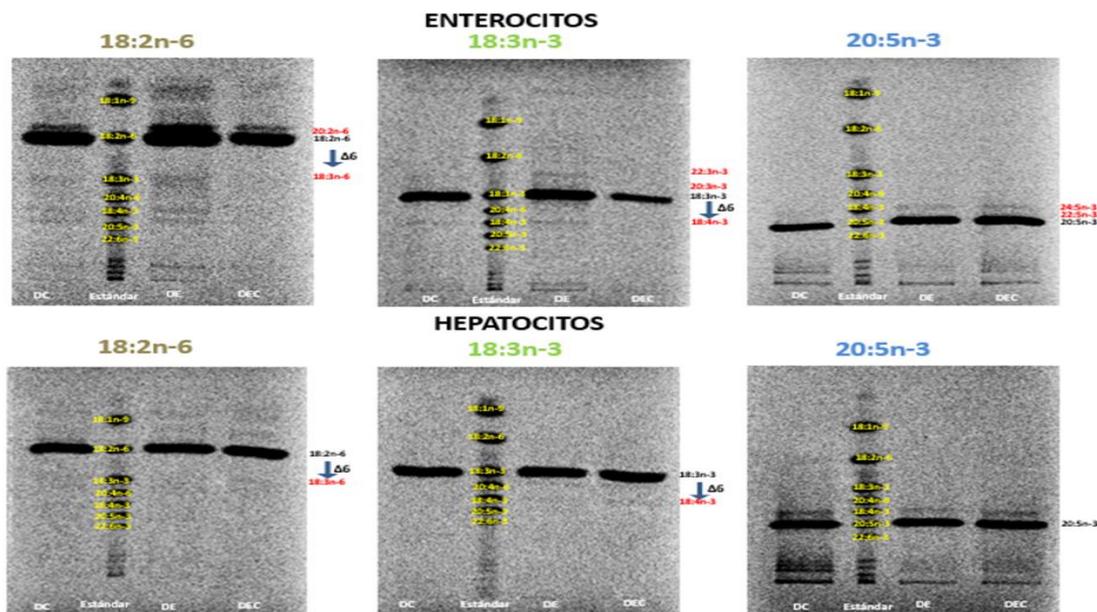
Si se observan los lípidos polares, en enterocitos, vemos un patrón de esterificación inverso al de los lípidos neutros, donde es el EPA el que tiende a esterificarse en los fosfolípidos en mayor cantidad, encontrándose proporciones significativamente más altas de éste que de los otros dos ácidos grasos, y siendo, en todos los casos, los grupos DC y DEC los que lo incorporan a fosfolípidos en mayor proporción.

Observando ahora los hepatocitos, nos encontramos la misma tendencia a esterificar el EPA en los fosfolípidos de membrana en mayor proporción que LA y ALA, excepto en fosfatidilserina, donde no observamos diferencias significativas en ninguno de los dos factores. Si nos fijamos en los niveles de incorporación radiactiva a la fosfatidilcolina, vemos que estos superan con creces a los de los otros lípidos polares, lo que sugiere que también esté actuando como reservorio de ácidos grasos poliinsaturados, teniendo en cuenta que, a la vista de los resultados, son estos ácidos grasos los que tienden a esterificarse en mayor proporción en los fosfolípidos de membrana que los precursores 18C, los cuales, tienden a almacenarse en forma de lípidos neutros, principalmente de

triglicéridos. Además, este almacenamiento se intensifica cuando le sometemos a una carencia de LC-PUFA con la dieta DE, lo que confirma lo señalado en el apartado 6.2.

### 6.6 Análisis de la actividad elongasa y desaturasa en el metabolismo mediante seguimiento radiactivo.

Debido a que las placas TLC deben estar un tiempo prolongado impresionándose (para detectar las bandas de los productos radiactivos) y no se dispone de un número fiable de muestras, se aporta una imagen sobre la que se explicará, de manera cualitativa, las principales tendencias observadas con respecto al metabolismo de los ácidos grasos n-3 y n-6 PUFA.



**Figura 5.** Patrón de bandas de seguimiento radiactivo en placa TLC de los ácidos grasos donde se han cultivado los diferentes tipos celulares. La banda oscura más gruesa indica el ácido graso con el que se ha cultivado (AL, ALA o EPA), las otras bandas de menor tamaño indican la transformación del ácido graso por la actuación de elongasas o desaturasas. Imagen tomada y editada por Nieves Guadalupe Acosta.

Como se observa en la figura, la actividad metabólica de PUFAs se hacen algo más evidente en enterocitos y en el grupo DE, debido a la deficiencia inducida y a su necesidad de compensarla. Asimismo, al tratarse en su mayoría de bandas situadas inmediatamente por encima del sustrato, se evidencia que la mayor actividad se corresponde con elongación y no con una desaturación.

En primer lugar, vemos que ambos tipos celulares poseen actividad Elolv 5, que se manifiesta con la presencia de una banda de 20:2 n-6, sintetizado a partir del LA radiactivo incorporado, otra banda de 20:3 n-3 y 22:3 n-3, elongados a partir del ALA incorporado y otras dos bandas en las placas de EPA, donde se produce una elongación

de éste hacia 22:5 n-3, que se elonga a su vez a 24:5 n-3. Todo ello concuerda con la actividad elongasa que se había postulado para ciertos productos presentes en las células control.

Por otro lado, no se observa la presencia de actividad  $\Delta 5$ , ya que no observamos ninguna banda de EPA ni ARA a partir de sus precursores en ninguna tipología celular, sin embargo, tal y como se había descrito en estudios previos (Greay, 2012; Greay, 2010), vemos que sí existe actividad  $\Delta 6$  en la lubina, puesto que se observa una banda de desaturación del 18:2 n-6 incorporado, correspondiente a 18:3 n-6 en los omega 6 y, de manera similar, otra en los n-3, donde se ha sintetizado 18:4 n-3 a partir de 18:3 n-3. No obstante, se observa que no se ha producido una elongación y desaturación final  $\Delta 6$  hacia la síntesis de DHA en la placa cultivada con EPA, lo que sugiere, por un lado, que se esté produciendo una inhibición competitiva a nivel de sustrato con el 18:3 n-3 o bien que la enzima actúe de una manera preferente hacia 18:3n-3 (Díaz-López, 2010). En todo caso, que los niveles de DHA no difieran significativamente entre los tres grupos a pesar de la deficiencia dietaria, no puede explicarse por una síntesis compensatoria de DHA a partir de sus precursores, ya que se evidencia que la enzima no tiene actividad en los últimos pasos de la ruta, al igual que la  $\Delta 5$ . Ello implica que la teoría más acertada, barajada a lo largo de la discusión, es que se esté dando una bioacumulación selectiva, sobre todo de DHA, por parte de los tejidos, todo ello facilitado por el equilibrio n-6/n-3 que ofrece el aceite de *Echium* y que ha permitido amortiguar sustancialmente el 50% de sustitución de LC-PUFA de origen marino por PUFA de origen vegetal.

## 7. CONCLUSIONES

1. La sustitución de un 50% del aceite de pescado por aceite de *Echium* no afecta de manera significativa a los niveles de EPA y DHA de los hepatocitos y enterocitos de la lubina, por lo que este aceite o mezclas de aceites vegetales n-6/n-3 equilibradas, podrían disminuir el índice FIFO sin disminuir las propiedades beneficiosas del pescado, suponiendo una alternativa sostenible en la elaboración de dietas para acuicultura.

2. El seguimiento metabólico de los ácidos grasos 18:2 n-6, 18:3 n-3 y EPA marcados con  $^{14}\text{C}$  radiactivo confirma que la lubina posee actividad  $\Delta 6$  desaturasa, si bien, ésta no parece ser suficiente, ni encontrarse activa en los últimos pasos de la ruta, al no detectarse la síntesis de DHA a partir de EPA.

## 8. CONCLUSIONS

1. A 50% substitution of fish oil by *Echium* oil does not significantly affect the EPA and DHA levels in European seabass hepatocytes and enterocytes, therefore, this oil, or other vegetable oil mixtures with a balanced n-6 / n-3, could help to decrease the FIFO ratio without reducing the beneficial properties of fish, being a good alternative in the development of sustainable diets in aquaculture.

2. The radioactive monitoring of 18:2 n-6, 18:3 n-3 and EPA fatty acids with <sup>14</sup>C confirms that the European seabass have a poor  $\Delta 6$  desaturase activity, that could be inhibited in the last steps of the rout, where no performs the synthesis of DHA from EPA.

## 9. AGRADECIMIENTOS

En estos 10 meses de trabajo, no solamente he aprendido que puedo superarme a mí mismo en multitud de situaciones, sino que, además, he visto que la importancia de la calidad humana a la hora de trabajar es esencial y ha hecho que disfrutara el triple de la elaboración de este TFG. Quiero agradecerle al personal del departamento, Diana, Sara, Manuel, Ana y Jose, por ofrecerme ayuda cada vez que la he necesitado y hacerme sentir como uno más desde el primer momento. A mi tutor Roberto, por transmitirme mucha seguridad en todo momento y por su completa disponibilidad cada vez que me ha sido requerida su ayuda, haciendo que se me contagie su pasión por la estadística. A mi tutora en la sombra, Covandonga, por su actitud compresiva y su carisma, haciendo que aprenda muchísimo en un periodo corto de tiempo y dándome la oportunidad de realizar este maravilloso TFG, con el que he disfrutado escribiendo cada párrafo. A Margarita, por romper la barrera alumno/profesor y por esas reuniones en el “fumadero”. A mi compañero de laboratorio Abel, porque los momentos del ‘natural con estevia’ en la cafetería sientan mejor con él y porque he descubierto una gran persona. A mi cotutora, Lupe, que ha mostrado una profesionalidad excepcional, simpatía y calidad humana envidiables, siendo mi mayor pilar de apoyo en el trabajo, con la que he podido compartir experiencias increíbles en la elaboración de este TFG a la vez que he descubierto una gran persona que, sin duda, va a dejar huella en mí.

Agradecer también a mi Padre... que me dejó hace dos años y se ha perdido la mitad de esta etapa, sin él esto tampoco hubiera sido posible y estoy seguro que se hubiera sentido orgulloso de haber llegado aquí. También agradecerles a todos mis amigos y familiares, en especial a Omar, Fela, Atasara, a mi hermana Peñita, a Peña y a mi madre, por

apoyarme y por su paciencia en los momentos más duros de este TFG, ustedes también han sido partícipes en este capítulo de mi vida, y ahora, me veo lo suficientemente preparado como para empezar el siguiente, ¡Muchísimas gracias a todos por haber formado parte de esto!

## 10. BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

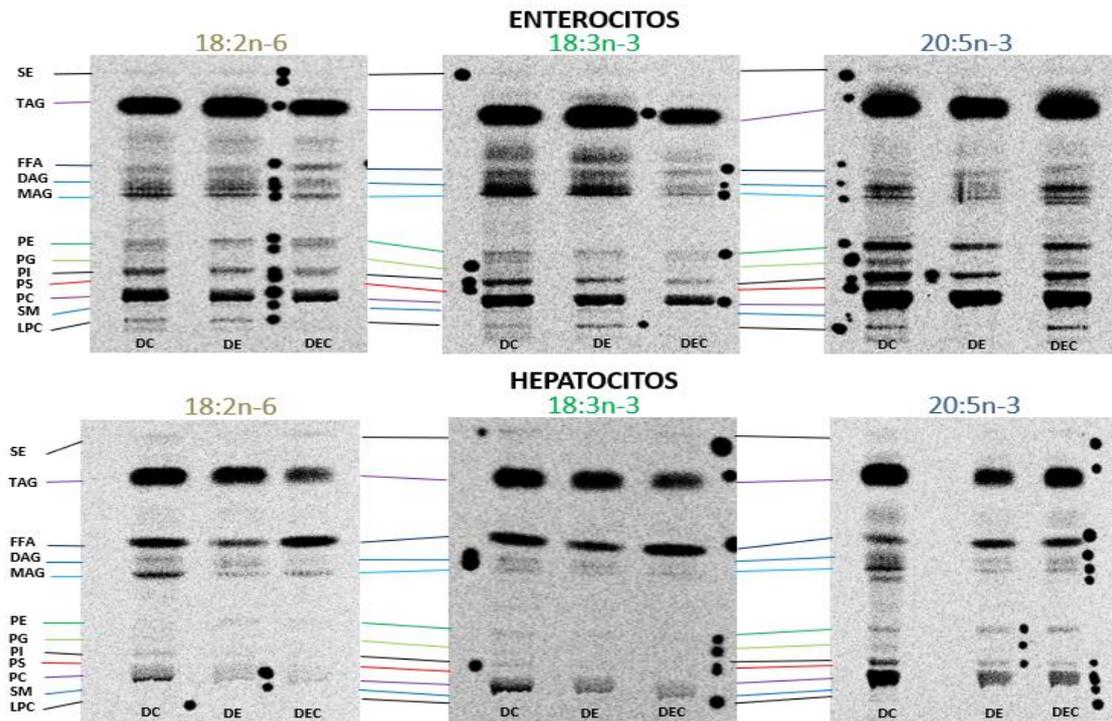
- Apraku, A., Huang, X., Yusuf, A., Cornel, A., Ayisi, C. L., & Asiedu, B. (2019). Impact of dietary oil replacement on muscle and liver enzymes activity, histomorphology and growth-related genes on Nile tilapia. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 223, 15–25.
- APROMAR. (2018). *La Acuicultura en España*.
- Bell, J., Pratoomyot, J., Strachan, F., Henderson, R., Fontanillas, R., Hebard, A. et al. (2010). Growth, flesh adiposity and fatty acid composition of Atlantic salmon (*Salmo salar*) families with contrasting flesh adiposity: Effects of replacement of dietary fish oil with vegetable oils. *Aquaculture*, 306(1-4): 225–232.
- Castro, L. F. C., Tocher, D. R., & Monroig, O. (2016). Long-chain polyunsaturated fatty acid biosynthesis in chordates: Insights into the evolution of Fads and Elovl gene repertoire. *Progress in Lipid Research*, 62, 25–40.
- Christie, W.W., 2003. *Lipid Analysis*. Third ed. The Oily Press, Bridgewater, UK, pp. 205-224
- Chung, H., Cho, Y., Do, H. J., Oh, K., Seo, W., & Shin, M. (2015). Plasma phospholipid arachidonic acid and lignoceric acid are associated with the risk of cardioembolic stroke. *Nutrition Research*, 35(11), 1001–1008.
- Cortés, E., Hidalgo, M. J., Rizo-Baeza, M. M., Aguilar, M. J., & Gil, V.. (2013). Índice elevado de ácidos grasos omega 6/omega 3 en niños con neuropatías causa o efecto. *Nutrición Hospitalaria*, 28(4), 1165-1170.
- Díaz López, M. (2010), Sustitución parcial de aceite de pescado por aceite de *Echium plantagineum* L. en la dieta de doradas de cultivo, *Sparus aurata* L. influencia sobre el crecimiento, estado de salud y metabolismo lipídico.
- FAO. (2018). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura (2018)*. Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible. Roma.
- Geay, F., Santigosa I Culi, E., Corporeau, C., Boudry, P et al. (2010). Regulation of FADS2 expression and activity in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) fed a vegetable diet. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 156(4), 237–243.
- Geay, F., Zambonino-Infante, J., Reinhardt, R., Kuhl, H., Santigosa, E., et al. (2012). Characteristics of fads2 gene expression and putative promoter in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*): Comparison with salmonid species and analysis of CpG methylation. *Marine Genomics*, 5, 7–13.
- Giménez, P. I. (2017). Efectos de la sustitución del aceite de pescado por una mezcla de aceites vegetales en el perfil de ácidos grasos del filete de la *Seriola dumerili*. Trabajo de Fin de Máster.
- Iñarra, B., Bald, C., San Martín, D., Orive, M., Cebrián, M. & Zufía, J. (2018) *Guía para la valorización de subproductos de la acuicultura*. AZTI, Derio, España.
- Izquierdo, P. et al. Analisis proximal, contenido de aminoacidos esenciales y relacion calcio/fosforo en algunas especies de pescado.(2001) *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias*, 11(2): 95.
- Lacombe, R., Chouinard-Watkins, R., & Bazinet, R. P. (2018). Brain docosahexaenoic acid uptake and metabolism. *Molecular Aspects of Medicine*, 64: 109–134.
- Lee, J., Lee, H., Kang, S., & Park, W. (2016). Fatty acid desaturases, polyunsaturated fatty acid regulation, and biotechnological advances. *Nutrients*, 8(1), 23.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., y Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265-275.
- Molina, C.A. (2016). Evaluación de varias fuentes de proteína vegetal en dietas para camarón *Litopenaeus vannamei*. Tesis Doctoral.
- Naylor, R., Hardy, R., Bureau, D., Chiu, A., Elliott, M., Farrell, et al(2009). Feeding aquaculture in an era of finite resources. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(42), p. 18040.

- Nelson, D. L., & Cox, M. (2009). *Lehninger. Principios de Bioquímica* (5ª ed.). Barcelona, España: Ediciones omega.
- Oboh, A., Kabeya, N., Carmona-Antoñanzas, G., Castro, L. F. C., Dick, J. R. et al (2017). Two alternative pathways for docosahexaenoic acid (DHA, 22:6n-3) biosynthesis are widespread among teleost fish. *Scientific Reports*, 7(1).
- Olsen, R. E., y Henderson, R. J. (1989). The rapid analysis of neutral and polar marine lipids using double-development HPTLC and scanning densitometry. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 129(2), 189-197.
- Rincón, M., Valenzuela, R & Valenzuela, A. (2015). El ácido estearidónico: un ácido graso omega-3 de origen vegetal con gran potencialidad en salud y nutrición. *Revista chilena de nutrición*, 42(3), 297-300.
- Rodríguez, C., Pérez, J. A., y Henderson, R. J. (2002). The esterification and modification of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids by hepatocytes and liver microsomes of turbot (*Scophthalmus maximus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 132(3), 559-570.
- Saini, R. K., & Keum, Y. (2018). Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: Dietary sources, metabolism, and significance — A review. *Life Sciences*, 203, 255–267.
- Sanz, F., Zamora Nazarro, S., Cruz-Rubio, V., Jover, M., Rodriguez, C. et al. (2009). *La nutrición y alimentación en piscicultura*. Madrid, España: CSIC, Publicaciones científicas y tecnológicas de la Fundación Observatorio Español de Acuicultura 1: 188-200.
- Sargent, J., Bell, G., McEvoy, L., Tocher, D., y Estevez, A. (1999). Desarrollos recientes en la nutrición de ácidos grasos esenciales del pescado. *Acuicultura*, 177 (1-4), 191-199.
- Schmitz, G., & Ecker, J. (2008). The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. *Progress in Lipid Research*, 47(2), 147–155.
- Stryer, L., Tymoczko, J. L., & Berg, J. M. (2007). *Bioquímica* (6ª ed.). Barcelona, España: Editorial Reverté.
- Tocher, D. R. (2003). Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Reviews in fisheries science*, 11(2), 107-184.
- Tocher, D. R., Bell, J. G., Strachan, F. & Good, J. E. (2006). Effect of dietary echium oil on growth, fatty acid composition and metabolism, gill prostaglandin production and macrophage activity in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Aquaculture Research*, 37(6), 606-617.
- Triana-García, P.A., Gutierrez-Espinosa, M., Esclava-Mocha, P.R. (2013). Rendimiento productivo e hígado graso en tilapia híbrida (*Oreochromis* spp): Influencia de dos fuentes de lípidos. *Orinoquia*, 17(2), 183-196.
- Valenzuela, R., Morales P, J., Sanhueza C, J., & Valenzuela, A. (2013). Ácido docosahexaenoico (DHA), un ácido graso esencial a nivel cerebral. *Revista chilena de nutrición*, 40(4), 383–390.
- Voortman, T., Van den Hooven, E. H., Braun, K. V., Van den Broek, M., Bramer, W. M., Chowdhury, R., & Franco, O. H. (2015). Effects of polyunsaturated fatty acid intake and status during pregnancy, lactation, and early childhood on cardiometabolic health: A systematic review. *Progress in Lipid Research*, 59, 67–87.
- Wilson, R., y Sargent, J. R. (1992). High-resolution separation of polyunsaturated fatty acids by argentation thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography A*, 623(2), 403-407.
- Zárate, R., el Jaber-Vazdekis, N., Tejera, N., Pérez, J. A., & Rodríguez, C. (2017). Significance of long chain polyunsaturated fatty acids in human health. *Clinical and translational medicine*, 6(1), 25.

### **Fuentes web**

- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. (2019). Estimación de precios de piensos. Recuperado 28 de mayo de [https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/alimentacion-animal/informepreciospiensossgmpgabrill2019\\_tcm30-501658.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/alimentacion-animal/informepreciospiensossgmpgabrill2019_tcm30-501658.pdf)

## 11. ANEXO 1



**Figura complementaria 1.** Patrón de esterificación en placas HPTLC de los ácidos grasos radiactivos en sus diferentes clases lipídicas. Las marcas oscuras indican la presencia del ácido graso radiactivo en sus clases lipídicas correspondientes. Imagen tomada y editada por Nieves Guadalupe Acosta González

## 12. ANEXO 2.

### EFFECTS OF DIETARY FISH OIL SUBSTITUTION BY *Echium* OIL ON ENTEROCYTE AND HEPATOCYTE LIPID METABOLISM OF EUROPEAN SEA BASS *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758)

A. Afonso<sup>1\*</sup>, N.G. Acosta<sup>1\*</sup>, R. Dorta-Guerra<sup>1</sup>, J.A. Pérez<sup>1</sup>, M.J. Pérez<sup>1</sup>, A. Lorenzo<sup>1</sup>, A. Bolaños<sup>1</sup>, C. Rodríguez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biología Animal, Edafología y Geología, Universidad de La Laguna, Spain.

\*Both authors have contributed equally to the study. Email: [ngacosta@ull.es](mailto:ngacosta@ull.es)

#### Introduction

The major carnivorous fish species farmed in Europe have traditionally been fed diets based on fish meal and fish oil (FO). Therefore, the replacement of FO with vegetable oils (VO) in aquafeeds is a viable alternative for the sustainability of the aquaculture industry. The poor ability of marine fish to convert C<sub>18</sub> polyunsaturated fatty acids (PUFA) to long chain PUFA (LC-PUFA) such as 20:4n-6 (ARA), 20:5n-3 (EPA) and 22:6n-3 (DHA), together with the fatty acid profile of VOs, lead to important changes in the fatty acid composition of flesh of fish fed VOs, and therefore in its nutritional value, which include decreased n-3 LC-PUFA and increased total fat and linoleic acid (18:2n-6, LA) contents. For these reasons, replacement of dietary FO must be approached with caution. In this sense, the *Echium* genus (*Boraginaceae*) seed oils, *Echium* oil, has an interesting fatty acid profile with a good n-3/n-6 PUFA balance and a high content of

unusual fatty acids, (stearidonic acid, SDA and  $\gamma$ -linolenic acid, GLA) that have competitive and inhibitory effects in the production of proinflammatory eicosanoids derived from ARA. Enterocytes and hepatocytes play critical roles in lipid metabolism including uptake, oxidation, conversion of fatty acids and the supply of LC-PUFA to the other tissues. Therefore, the aim of this study is to evaluate the effects of 50% substitution of dietary FO by *Echium* oil.

## Materials and methods

Sea bass juveniles with an initial body weight of around 150 g were distributed into 9 tanks. Three of them were fed a commercial diet (CD), containing FO, during the whole experiment, 7 months. The other six ones were fed an experimental diet (ED) with 50% FO and 50% VO, during 4 months, that was the time in which VO composition was reflected in the muscle. Thereafter, three of these tanks continued receiving the experimental diet (7 months in total) while the other three turned back to the commercial diet (experimental-commercial diet, ECD) to the end of the experimental period. Fish were fed *ad libitum*, reared under constantly flowing seawater, and natural photoperiod at 19–19.5 °C. At the end of the experiment, the individuals were slaughtered by a sharp blow to the head, individually measured and weighed. Samples of blood, muscle and several tissues were taken for biochemical analysis. In addition, samples of intestine and liver were collected to isolate enterocytes and hepatocytes respectively. Part of both cellular suspensions were incubated with  $^{14}\text{C}$  radiolabelled fatty acids to perform fatty acid metabolic studies, and the other were used to carry out the control lipid profile studies. The entire experiment was conducted in accordance with the Spanish law in BOE 8th April 2013 for protection of experimental animals.

## Results

The metabolic studies using radiolabelled fatty acids indicated that although desaturase delta 6 activity is present it is not directly implicated in EPA conversion to DHA, but in the conversion of 18:2n-6 to 18:3n-6 and of 18:3n-3 to 18:4n-3. Elongation activity was evident for several substrates and no delta 5 activity was detected.

After 7 months of experiment the control fatty acid profile of enterocytes and hepatocytes were analyzed and no significant differences in DHA, n-3 LC-PUFA levels and n-3/n-6 index were found between the 3 treatments. The lipid classes profile of control cells was also analyzed and there were not significant differences in total polar lipids, although there was an increase in triglycerides in ED fish group.

## Discussion and conclusions

Although the DHA level in the experimental diet was half that of the commercial diet, and there is no DHA production from EPA, it seems that the *Echium* diet has induced a selective retention of DHA. Our present results suggest that the balanced n-6/n-3 composition of *Echium* oil provides a compensatory effect on the fatty acid metabolism and tissue deposition similarly to that reported for *Sparus aurata* by our group (Díaz-López et al., 2009; 2010).

The balanced composition of *Echium plantagineum* oil not only did not affect the DHA levels in sea bass but enhanced some parameters of interest like polar lipids and LC-PUFA after returning to the control marine based diet. *Echium* oil might be considered as a more sustainable alternative to other VO in animal diets, providing a health promoting profile for human consumption.

## References

- Díaz-López, M., Pérez, M.J., Acosta, N.G., Tocher, D.R., Jerez, S., Lorenzo, A., and Rodríguez, C., 2009. Effect of dietary substitution of fish oil by *Echium* oil on growth, plasma parameters and body lipid composition in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture Nutrition*, 15: 500-515.
- Díaz-López, M., Pérez, M.J., Acosta, N.G., Jerez, S., Dorta-Guerra, R., Tocher, D.R., Lorenzo, A., and Rodríguez, C. 2010. Effects of dietary fish oil substitution by *Echium* oil on enterocyte and hepatocyte lipid metabolism of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Comp. Biochem. Physiol. (B)*, 155: 371-379.

## Acknowledgment

This study was supported by grants AGL 2003-06677 and CTM 2006-14279-C02-02 from the Spanish “Ministerio de Educación y Ciencia”. Radiactivity was processed and measured at SEGAI (ULL). C. Rodríguez and A. Bolaños are members of ITB (Canary Islands).